

Technische Universität Dresden
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
Fachrichtung Biologie

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung mitochondrialer Proteinkinasen und -phosphatasen in *Saccharomyces cerevisiae*

vorgelegt von

Dipl.-Biol.

Uta Gey

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerhard Rödel, Technische Universität Dresden
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Johannes Herrmann, Technische Universität Kaiserslautern

Tag der Einreichung: 07.09.2012

Tag der Disputation: 16.11.2012

*Wissen verwandelt Fragen in Antworten.
Weisheit verwandelt Antworten in Fragen.*

Karl-Heinz Karius

Aus aktuellen Gründen wurden Teile dieser Arbeit bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Gey, U., Czupalla, C., Hoflack, B., Rödel, G. und Krause-Buchholz, U. (2008)

Yeast pyruvate dehydrogenase complex is regulated by a concerted activity of two kinases and two phosphatases. *J Biol Chem* (**283**): p.9759-9767.

Gey, U., Czupalla, C., Hoflack, B., Krause-Buchholz, U. und Rödel, G. (2012)

Proteomic analysis reveals a novel function of the kinase Sat4p in yeast mitochondria. *Mitochondrion* (under review)

Tagungsbeiträge:

Gey, U., Krause-Buchholz, U. und Rödel, G. (2006)

Regulation of enzyme activity and assembly of the pyruvate dehydrogenase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: Functional characterization of the newly identified mitochondrial protein kinase Pkp1p and phosphatase Ppp1p.

Tagung "*Biology of Yeasts and Filamentous Fungi*", Frankfurt/Main

Gey, U., Czupalla, C., Hoflack, B., Rödel, G. und Krause-Buchholz, U. (2008)

Yeast pyruvate dehydrogenase complex is regulated by a concerted activity of two kinases and two phosphatases.

Kongress "*XX International Congress of Genetics*", Berlin

Gey, U., Krause-Buchholz, U. und Rödel, G. (2009)

A link between ROS production and halotolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Molecular and functional characterization of the protein kinase Sat4p.

Leopoldina-Symposium „*Molecular Genetics of Chloroplasts and Mitochondria*“, Berlin

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGEN	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 PROTEINPHOSPHORYLIERUNG.....	1
1.2 EUKARYOTISCHE PKASEN UND PPASEN	3
1.3 PROTEINPHOSPHORYLIERUNG IN MITOCHONDRIEN	4
1.4 BEISPIELE FÜR DIE REGULATION MITOCHONDRIALER FUNKTIONEN DURCH PHOSPHORYLIERUNG IN HÖHEREN EUKARYOTEN.....	5
1.5 MITOCHONDRIALE PROTEINPHOSPHORYLIERUNG IN <i>S. CEREVISIAE</i>	7
1.6 PHOSPHOPROTEOMANALYSEN UND DEREN HERAUSFORDERUNGEN	10
1.7 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	12
2 MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 MATERIAL.....	14
2.1.1 Zentrifugen.....	14
2.1.2 Feinchemikalien.....	14
2.1.3 Verbrauchsmaterial und Kit-Systeme	15
2.1.4 Plasmide	15
2.1.5 Oligonukleotide	16
2.1.6 Enzyme.....	17
2.1.7 Größenstandards.....	17
2.1.8 Antikörper	17
2.1.9 <i>E. coli</i> - Stämme	18
2.1.10 <i>S. cerevisiae</i> – Stämme.....	18
2.1.11 Kultivierungsmedien	20
2.1.11.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	20
2.1.11.2 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	21
2.2 GENETISCHE METHODEN	22
2.2.1 Kreuzung von <i>S. cerevisiae</i> - Stämmen, Sporulation und Tetradenanalyse	22
2.2.2 Analyse der <i>rho</i> ⁰ -Bildungsrate bei <i>S. cerevisiae</i>	22
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	23
2.3.1 Charakterisierung des Wachstums von <i>S. cerevisiae</i> - Stämmen.....	23
2.3.1.1 Analysen auf Festmedium	23
2.3.1.2 Analysen in Flüssigkultur (Nephelometer).....	23

2.3.2	Amplifikation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	23
2.3.2.1	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i>	24
2.3.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	24
2.3.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	24
2.3.3	DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
2.3.3.1	Diagnostische PCR	24
2.3.3.2	Amplifikation von Integrationskassetten mittels SFH-PCR	25
2.3.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	26
2.3.5	Isolierung von DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	27
2.3.5.1	Minipräparation genomischer DNA	27
2.3.5.2	Schnelle Präparation einer DNA- Rohfraktion („Kolonie- PCR“)	28
2.3.6	DNA-Agarosegelelektrophorese	28
2.3.7	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	28
2.3.8	Bestimmung der DNA-Konzentration (UV-Absorptionsmessung)	29
2.4	BIOCHEMISCHE METHODEN	29
2.4.1	Präparation von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	29
2.4.1.1	Mechanische Präparation	29
2.4.1.2	Enzymatische Präparation	30
2.4.1.3	Reinigung der Mitochondrien durch Saccharose- Gradienten-Zentrifugation und NaCl- Behandlung	31
2.4.2	Proteinase K-Behandlung von Mitochondrien und Mitoplasten	32
2.4.3	Gesamtproteinextraktion	32
2.4.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	32
2.4.5	Fällung von Proteinen aus Lösungen	32
2.4.5.1	TCA-Fällung	32
2.4.5.2	Methanol-Chloroform Fällung (nach Wessel & Flügge, 1984)	33
2.4.6	λ -Phosphatasebehandlung	33
2.4.7	Co-Immunopräzipitation	33
2.4.8	Tandem-Affinitätsreinigung (TAP-Methode)	34
2.4.9	SDS-PAGE	34
2.4.10	Western Blot	35
2.4.11	Immunologische Detektion	36
2.4.12	„Stripping“ und Reprobing von PVDF-Membranen	36
2.4.13	BN/CN-PAGE	36
2.4.13.1	Gießen eines Gradientengels	37
2.4.13.2	Probenvorbereitung (Lyse)	37
2.4.13.3	Elektrophoresebedingungen	38

2.4.13.4	Zweite Dimension	38
2.4.14	2D-DIGE	39
2.4.14.1	Lyse von Mitochondrien und Markierung mit CyDyes (DIGE)	39
2.4.14.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	40
2.4.14.3	Zweite Dimension (SDS-PAGE)	41
2.4.14.4	Dokumentation und Quantifizierung von DIGE-Gelen	41
2.4.15	Färbung von Proteingelen	42
2.4.15.1	<i>Pro-Q® Diamond</i> Phosphoproteinfärbung	42
2.4.15.2	<i>Deep Purple™</i> Gesamtproteinfärbung	42
2.4.15.3	Gesamtproteinfärbung mit Coomassie® Brilliantblau	42
2.4.15.3.1	Klassische Färbung	42
2.4.15.3.2	Colloidale Coomassiefärbung (nach Neuhoff)	42
2.4.16	<i>in gel</i> Aktivitätsnachweise	43
2.4.16.1	<i>in gel</i> PDH-Assay	43
2.4.16.2	<i>in gel</i> ATPase-Assay	43
2.4.17	Photometrische Enzymaktivitätsmessungen	44
2.4.17.1	Messung von Dehydrogenase-Aktivitäten (PDH, KGDH, IDH)	44
2.4.17.2	Aconitase-Aktivitätsmessung	45
2.4.18	Massenspektrometrie	45
2.4.18.1	MALDI-MS	45
2.4.18.2	nanoLC-MS/MS	46
2.4.18.3	Bestimmung der Phosphorylierungsstelle von Pda1p	46
3	ERGEBNISSE	47
3.1	PROTEOMANALYSE AUSGEWÄHLTER DELETIONSSTÄMME PUTATIVER MITOCHONDRIALER KINASEN UND PHOSPHATASEN	47
3.1.1	Bioinformatische Analysen zur Auswahl potentieller Kandidaten	47
3.1.2	Optimierung der 2D-Gelelektrophorese zur Analyse mt Proteome	49
3.1.3	2D-DIGE Analyse der zehn ausgewählten Kinase- bzw. Phosphatase-Deletionsstämme	51
3.2	FUNKTIONELLE ANALYSEN ZUR REGULATION DES PDH-KOMPLEXES	55
3.2.1	Lokalisationsstudie von Pkp2p, Ppp2p und Yhr076wp	55
3.2.2	Analyse der PDH-Aktivität in den Kinase- bzw. Phosphatase-Deletionsstämmen	58
3.2.2.1	<i>in-gel</i> PDH-Aktivitätsfärbung nach Separation mittels CN-PAGE	58
3.2.2.2	Biochemische Analyse der PDH-Aktivität	60
3.2.3	Phänotypische Analyse der Kinase- bzw. Phosphatase- Deletionsstämme	62
3.2.4	Analysen zur Identifizierung des Targets der Phosphorylierung	63

3.2.4.1	2D-Analyse mit Phosphoprotein-spezifischer Färbung	63
3.2.4.2	Detaillierte quantitative Analyse von Pda1p	66
3.2.4.3	Analyse der Phosphorylierungsstelle durch Massenspektrometrie	68
3.2.5	Herstellung und Analyse der Doppeldeletionsstämme $\Delta pkp1+2$ und $\Delta ppp1+2$	69
3.2.5.1	Generierung der Doppeldeletionsstämme durch Kreuzung	69
3.2.5.2	PDH-Aktivitätsmessung in $\Delta pkp1+2$ und $\Delta ppp1+2$	70
3.2.5.3	Proteomanalyse und Quantifizierung von Pda1p in $\Delta pkp1+2$ und $\Delta ppp1+2$	71
3.2.6	Analyse der molekularen Organisation von Pkp2p und Ppp2p	73
3.2.7	Analyse der molekularen Organisation des PDH-Komplexes in $\Delta pkp2$ und $\Delta ppp2$	74
3.2.8	Interaktionsanalyse von Pkp1p und Pkp2p	76
3.3	ANALYSEN ZUR FUNKTION DER PUTATIVEN MT KINASE SAT4P	77
3.3.1	Lokalisationsstudie von Sat4p	78
3.3.2	Analyse der Sat4p-Proteinisoformen	80
3.3.3	Klonierung einer SAT4-Überexpressionsmutante	81
3.3.4	Komparative Analyse des mt Proteoms im WT und Tet-Sat4	83
3.3.5	Analysen zur Lipoylierung von Lat1p, Kgd2p und Gcv3p	87
3.3.6	Analyse der „steady-state“-Konzentration von Aco1p	89
3.3.7	Aktivitätsmessungen mt Enzymkomplexe	90
4	DISKUSSION	92
4.1	ANALYSEN DES MT PROTEOMS VON <i>S. CEREVISIAE</i>	92
4.2	DIE REGULATION DES PDH-KOMPLEXES IN <i>S. CEREVISIAE</i>	94
4.3	CHARAKTERISIERUNG DER KINASE SAT4P	105
5	ZUSAMMENFASSUNG	111
6	LITERATUR	113
7	ANHANG	128
	DANKSAGUNG	137
	VERSICHERUNG	138

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellen

Tab. 1	Ausgewählte PKasen bzw. PPasen mit potentieller mt Funktion.	47
Tab. 2	Proteine veränderter Abundanz in den Kinase-/Phosphatase-Deletionsstämmen.	53
Tab. 3	Proteine veränderter Abundanz nach Überexpression von Sat4p.	85

Abbildungen

Abb. 1	Die reversible Proteinphosphorylierung und deren biologische Bedeutung.	2
Abb. 2	Die Regulation mt Funktionen durch reversible Phosphorylierung.	6
Abb. 3	Putative Signalübermittlungswege in Mitochondrien durch Phosphorylierung.	8
Abb. 4	Schematische Darstellung verschiedener Vorgehensweisen zur Analyse von Phosphoproteomen.	11
Abb. 5	Optimierung der 2D-IEF/SDS-PAGE zur Separation des mt Proteoms.	50
Abb. 6	Auswertung der vergleichenden DIGE-Analyse des WT und der zehn PKase- bzw. PPase- Deletionsstämme.	52
Abb. 7	Lokalisationsstudie der Kinasen Pkp1p und Pkp2p und der Phosphatasen Ppp1p, Ppp2p und Yhr076wp.	56
Abb. 8	Proteinase K-Behandlung von Mitochondrien sowie Mitoplasten des Stammes Ppp2-HA.	57
Abb. 9	„in gel“-Aktivitätsassay zum Nachweis der PDH-Aktivität im WT sowie den Deletionsstämmen der putativen PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen.	59
Abb. 10	Photometrischer PDH-Aktivitätsassay des WT sowie der Deletionsstämme der putativen PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen.	61
Abb. 11	Wachstumsanalyse des WT sowie der Deletionsstämme der PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen.	62
Abb. 12	2D-IEF/SDS-PAGE mt Proteine mit anschließender Phosphoprotein- und Gesamtprotein-Färbung.	64
Abb. 13	Quantifizierung der Pda1p-Spots nach 2D-Separation (A) und Detektion der „steady-state“- Konzentration von Pda1p nach 1D-Separation (B).	67

Abb. 14	Pda1p- MS/MS Spektrum von m/z 804,81 ²⁺ mit Fragmentzuordnung.	68
Abb. 15	Diagnostische PCR zum Deletionsnachweis der <i>PKP</i> - bzw. <i>PPP</i> -ORFs.	70
Abb. 16	Photometrischer PDH-Aktivitätsassay des WT sowie der Doppeldeletionsstämme $\Delta pkp1+2$ und $\Delta ppp1+2$.	71
Abb. 17	2D-DIGE-Analyse (A) und Quantifizierung der Pda1p-Spots (B) im WT (BY4741) und den Stämmen $\Delta pkp1+2$ und $\Delta ppp1+2$.	72
Abb. 18	Molekulare Organisation von Pda1p, Ppp2p sowie Pkp2p.	73
Abb. 19	Molekulare Organisation des PDH-Komplexes im WT (BY4741) sowie den Deletionsstämmen $\Delta ppp2$ und $\Delta pkp2$.	75
Abb. 20	Interaktionsnachweis der PDH-Kinasen Pkp1p und Pkp2p mittels TAP-Methode (A) und Co-Immunopräzipitation (B).	76
Abb. 21	Lokalisationsstudie der Kinase Sat4p	78
Abb. 22	Einfluss verschiedener reduzierender Agenzien (A) sowie einer λ -Phosphatasebehandlung (B) auf die Migrationsformen von Sat4p-cMyc.	80
Abb. 23	Diagnostische PCR zum Nachweis der Integration des <i>TET</i> -Promotors (A) und Western Blot-Analyse zum Nachweis der Sat4p-Überexpression (B).	82
Abb. 24	Wachstumsanalyse des WT (BY4741) und der Stämme $\Delta sat4$ und Tet-Sat4.	83
Abb. 25	2D-DIGE mt Proteine des WT (BY4741) und des Stammes Tet-Sat4.	84
Abb. 26	MS/MS-Analyse der Lipoylierung der Proteine Lat1p, Kgd2p und Gcv3p.	87
Abb. 27	„Steady-state“-Konzentration von Aco1p in Abhängigkeit von <i>SAT4</i> .	90
Abb. 28	Aktivitäten mt Enzyme in Abhängigkeit von <i>SAT4</i> .	91
Abb. 29	Modell der Regulation des PDH-Komplexes in <i>S. cerevisiae</i> .	104
Abb. 30	Modell der putativen Funktion der Kinase Sat4p in den Mitochondrien.	109

Abkürzungen

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
Acc. no.	<i>Accession number</i> ; Bezugsnummer
ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
amp	Ampicillin
AMPK	AMP-abhängige Kinase
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i> -Protein
BN	<i>blue native</i> ; Blaue native (Gelelektrophorese)
bp/kbp	Basenpaare / Kilobasenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> ; Cyclin-abhängige Kinase
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
cMyc	<i>cellular myelocytomatosis oncogen</i> ; zelluläres Myelocytomatose-Onkogen
CN	<i>clear native</i> ; „Farblose“ native (Gelelektrophorese)
CoA	Coenzym A
COX	Cytochrom c Oxidase
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-terminal	carboxylterminal
Da/kDa/MDa	Dalton / Kilodalton / Megadalton
DIGE	<i>difference gel electrophoresis</i> ; Differentielle Gelelektrophorese
DMF	N,N- Dimethylformamid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i> ; verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
HA	Hämagglutinin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettich-Peroxidase
IDH	Isocitratdehydrogenase
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IMM	<i>inner mitochondrial membrane</i> ; innere Mitochondrienmembran
IMS	<i>intermembrane space</i> ; Zwischenmembranraum

IPG	immobilisierter pH-Gradient
KGDH	α -Ketoglutaratdehydrogenase
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LC	<i>liquid chromatography</i> ; Flüssigchromatographie
LiAc	Lithiumacetat
m/z	<i>mass to charge ratio</i> ; Masse-zu-Ladungsverhältnis (eines Peptids)
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i> ; Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MAPK	mitogen aktivierte Protein-Kinase
MM	Minimalmedium
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mt	mitochondrial (bzw. deklinierte Form dessen)
NAD ⁺	β -Nicotinamid-adenindinukleotid
NADH	reduziertes β -Nicotinamid-adenindinukleotid
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium</i> ; Nitrotetrazoliumblau
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
OMM	<i>outer mitochondrial membrane</i> ; äußere Mitochondrienmembran
ORF	<i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen
P	Phosphat, Phospho-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PEG	Polyethylenglykol
pI	isoelektrischer Punkt
PIK	Phosphatidylinositol-Kinase
PI-Mix	Protease-Inhibitor-Mix
PKA	Protein-Kinase A
PKase	Protein-Kinase
PMF	<i>peptide mass fingerprinting</i> ; Peptidmassen-„Fingerabdruck“
PMS	Phenazinmethosulfat
PPase	Protein-Phosphatase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SGD	<i>Saccharomyces genome database</i> ; <i>Saccharomyces</i> Genomdatenbank
SFH	<i>short flanking homology</i> ; kurze Sequenzhomologie
SILAC	<i>stable isotope labelling by amino acids in cell culture</i> ; Markierung mit stabilen Aminosäureisotopen in Zellkultur
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> ; Einzelstrang-DNA

TAP	<i>tandem affinity purification</i> ; Tandem-Affinitätsreinigung
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> ; Trichloroessigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	<i>tabacco etch virus</i> ; Tabakmosaikvirus
TOF	<i>time of flight</i> ; Flugzeit (eines Peptids im Flugzeitanalysator)
TOM	<i>translocase of outer membrane</i> ; Translokase der äußeren Membran
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
üN	über Nacht
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett
v/v	Volumenanteil/Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil/Volumenanteil
WT	Wildtyp
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i> ; Hefe-Stickstoff (Basis)
YP	<i>yeast extract/peptone</i> ; Hefeextrakt/Pepton (Vollmedium)
ZNG	Zellnassgewicht

Proteinogene Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Genetische Nomenklatur

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Nomenklatur für *Saccharomyces cerevisiae* entspricht den in der *SGD* (www.yeastgenome.org) vorgegebenen Richtlinien nach Cherry *et al.* [1] und ist nachfolgend an einem Beispiel gezeigt.

<i>PDA1</i>	dominantes (Wildtyp)-Allel
<i>pda1</i>	rezessives (Mutanten)-Allel
$\Delta pda1$	Deletion (Nullmutation) eines Gens
Pda1p	Protein (Genprodukt)

1 Einleitung

1.1 Proteinphosphorylierung

Posttranslationale Modifikationen von Proteinen spielen bei der Regulation von nahezu allen biologischen Prozessen sowohl bei Prokaryoten als auch Eukaryoten eine essentielle Rolle [2,3]. Spezifische Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierung, Glykosylierung und Acylierung können sowohl die Struktur als auch Dynamik eines Proteins beeinflussen. Insgesamt sind in der Literatur mehr als 200 verschiedene Arten posttranslationaler Modifikationen bekannt, wobei die reversible Proteinphosphorylierung die häufigste und am weitesten verbreitete darstellt [4]. Erstmals gelang es Fischer und Krebs im Jahr 1955 am Beispiel der Glykogen-Phosphorylase eine Regulation von Enzymaktivitäten durch diese Modifikation zu zeigen [5]. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass 30-50 % aller Proteine einer eukaryotischen Zelle Target der Phosphorylierung sind [6,7]. Dabei gibt es deutliche Unterschiede in der Stabilität der Modifikation bzw. dem Verhältnis zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem Protein. Während einige Proteine stetig quantitativ phosphoryliert vorliegen, sind andere nur transient modifiziert und der Anteil des entsprechenden Phosphoproteins in der Zelle liegt nur bei etwa 1-2 % [4].

Anhand des modifizierten Aminosäure(AS)-Restes bzw. der entstehenden Bindung unterscheidet man mehrere Arten der Phosphorylierung [8]: (i) O-Phosphate (O-Phosphomonoester) entstehen durch die Modifikation von AS wie Serin, Threonin oder Tyrosin, (ii) N-Phosphate (Phosphoamide) werden durch die Phosphorylierung von Arginin, Lysin oder Histidin gebildet und (iii) Acyl-Phosphate (Phosphoanhydride) entstehen durch die Phosphorylierung von Aspartat oder Glutamat. Während N- sowie Acylphosphate in Prokaryoten häufig vertreten sind, findet man diese Arten der Modifikation in Eukaryoten eher selten [9]. Phosphorylierungen finden hier überwiegend an Serin-, Threonin- sowie Tyrosin-Seitenketten in einer Häufigkeit von etwa 1000:100:1 statt [10]. Einschränkend muss jedoch hinzugefügt werden, dass auch die sehr unterschiedlichen Stabilitäten der verschiedenen Phosphorylierungen einen entscheidenden Einfluss auf die experimentellen Analysen haben. Während O-Phosphorylierungen vergleichsweise stabil sind, hydrolysieren Phosphoamide und Phosphoanhydride sehr schnell und können aufgrund dessen in vielen Untersuchungen nicht detektiert werden [11].

Obgleich die kovalente Verknüpfung eines Phosphatrestes an ein Protein keinen bemerkenswerten Einfluss auf dessen molekulares Gewicht hat, führt sie in den meisten

Fällen zu einer Änderung der Konformation und damit der funktionellen Struktur des Targets [12]. Dadurch kann nicht nur die enzymatische Aktivität eines Proteins, sondern auch dessen Stabilität, subzelluläre Lokalisation sowie die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst werden [13]. Diese reversible Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung spielt in vielen zellulären Prozessen wie beispielsweise der Regulation metabolischer Enzyme, Signaltransduktion, Transkription und Translation sowie Apoptose eine entscheidende Rolle (Abb. 1; [11,14]).

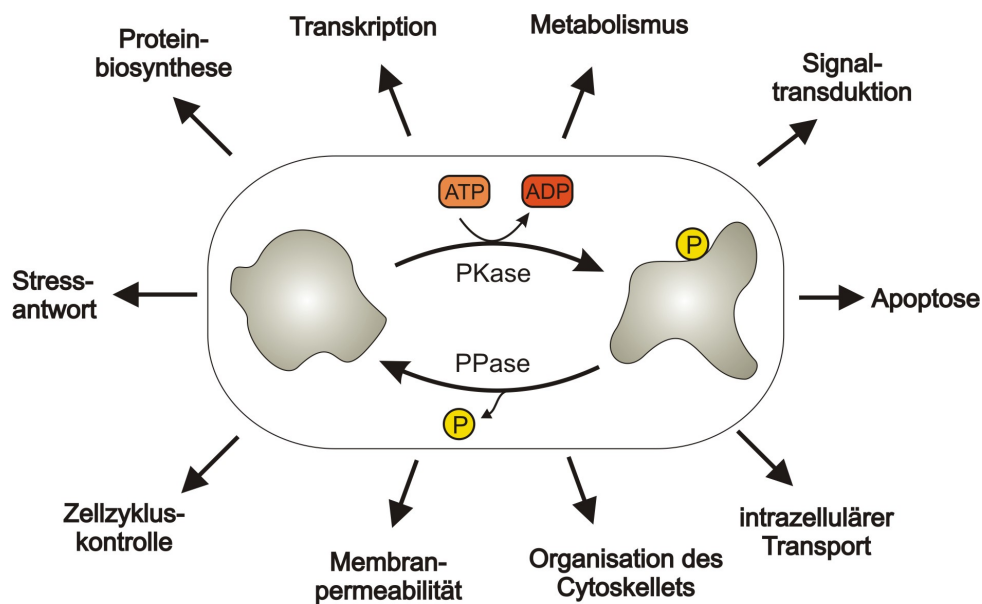


Abb. 1 Die reversible Proteinphosphorylierung und deren biologische Bedeutung.

Die Phosphorylierung eines Proteins wird von Proteinkinasen (PKasen) unter Verwendung von ATP realisiert und führt meist zur Konformationsänderung. Proteinphosphatasen (PPasen) katalysieren die Rückreaktion durch hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe. Die Proteinphosphorylierung spielt bei der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozessen eine Rolle [11,14], von denen eine Auswahl in der Abbildung dargestellt ist.

Die Katalyse der Proteinphosphorylierung erfolgt durch zwei antagonistisch wirkende Enzymklassen. Proteinkinasen (PKasen) phosphorylieren das Zielprotein, indem sie unter Nutzung von ATP einen Phosphatrest auf eine spezifische AS-Seitenkette übertragen. Die Rückreaktion wird durch Proteinphosphatasen (PPasen) katalysiert, welche die Phosphoesterbindung hydrolytisch spalten und damit das Protein dephosphorylieren (Abb. 1). Das Konzentrationsverhältnis sowie die Aktivität der entsprechenden PKase und PPase entscheidet über den Phosphorylierungszustand eines Proteins [15]. Etwa 3 % der im humanen Genom codierten Proteine sind PKasen und PPasen [16], was die enorme Bedeutung der Proteinphosphorylierung in der Zelle verdeutlicht.

1.2 Eukaryotische PKasen und PPasen

Eukaryotische PKasen bilden die größte aller Proteinfamilien und machen – je nach Organismus – 1,5-2,5 % aller codierenden Gene aus [17]. Alle bisher bekannten eukaryotischen PKasen besitzen eine hochkonservierte katalytische Domäne von ~ 250-300 AS [18]. Außerhalb dieser Domäne besteht hingegen eine starke Strukturheterogenität hinsichtlich verschiedenster regulatorischer Domänen, wodurch die Spezifität für ein bestimmtes Zielprotein vermittelt wird. Die Klassifizierung der Kinasen erfolgt in der Regel anhand ihrer Target-Aminosäure: (i) Ser/Thr-PKasen, (ii) Tyr-PKasen, (iii) His-PKasen (phosphorylieren auch Lys und Arg) und (iv) Asp/Glu-PKasen. Eine weitere Unterteilung in Kinase-Familien orientiert sich an strukturellen Homologien und Substraten [19,20] oder am Regulationsmechanismus [14]. Die Regulation der Aktivität der PKasen erfolgt auf vielfältige Art und Weise. Neben der Phosphorylierung der Kinase spielen subzelluläre Lokalisation, Proteinakkumulation und die Bindung von Protein- oder Nicht-Protein-Liganden eine Rolle [21]. Ein Beispiel für den zuletzt genannten Mechanismus ist die Kontrolle durch regulatorische Untereinheiten, die mit Hilfe von Signalmolekülen wie Ca^{2+} /Calmodulin oder cAMP (cAMP-abhängige PKasen) gesteuert werden. Der häufigste Regulationsmechanismus ist jedoch die autokatalytische oder durch andere PKasen vermittelte Phosphorylierung der Kinase. Findet diese Modifikation innerhalb der katalytischen Domäne statt, hat sie immer einen aktivierenden Effekt, während solche außerhalb der Domäne sowohl aktivierend als auch inaktivierend wirken können [22].

Die Klassifizierung der PPasen erfolgt in Eukaryoten anhand der Struktur der katalytischen Domäne in drei Familien, welche ihr Zielprotein an Ser/Thr (PPP, PPM) bzw. Tyr (PTP) dephosphorylieren [23]. Die Mitglieder der PPP-Familie werden in zwei Klassen (Typ 1 und 2) unterteilt, die sich hinsichtlich ihrer Sensibilität gegenüber hitzestabilen Proteinen unterscheiden [15]. Die Subklassifizierung der PPM-Familie erfolgt anhand der benötigten Cofaktoren in die Gruppen PP2A, PP2B und PP2C. Während PPasen des Typs 2A keine Kationen als Cofaktoren benötigen, ist die Aktivität von Typ2B-PPasen Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig. Für die Funktion der PPasen vom Typ 2C sind Mg^{2+} -Ionen essentiell [15,24].

Interessanterweise ist die Zahl der codierten PPasen in allen eukaryotischen Organismen deutlich geringer als die der PKasen. In der Hefe *Saccharomyces (S.) cerevisiae* liegt beispielsweise die in der Literatur angegebene Zahl der Proteinkinasen in Abhängigkeit der Berücksichtigung atypischer PKasen zwischen 122 [25] und 130 [17], denen lediglich 32 PPasen gegenüberstehen [26]. Im humanen Genom werden 518 Kinasen codiert, von denen 428 Ser/Thr-Kinasen sind und 90 zur Familie der Tyr-Kinasen zugeordnet werden.

Demgegenüber existieren etwa 147 PPasen, von denen nur 40 ihr Target an Ser/Thr dephosphorylieren und alle anderen den Tyr-PPasen zugeordnet werden [27]. Dieses Verhältnis impliziert, dass PKasen in der Regel nur spezifisch für ein oder wenige Proteine sind, während insbesondere Ser/Thr-PPasen häufig verschiedene Proteine dephosphorylieren können. Eine intensive Regulation ist nötig um sicherzustellen, dass Phosphatasen die entsprechenden Targetproteine zum richtigen Zeitpunkt dephosphorylieren. Hierbei sind - ähnlich der Regulation von Kinasen - verschiedene Mechanismen wie etwa subzelluläre Lokalisation, Modifikationen sowie die Interaktion mit Liganden oder anderen Proteinen bekannt [27].

1.3 Proteinphosphorylierung in Mitochondrien

Mitochondrien sind essentielle Organellen eukaryotischer Zellen, in denen eine Vielzahl metabolischer Stoffwechselwege stattfinden (Überblick in [28-30]). Neben der Synthese von ATP durch die oxidative Phosphorylierung an den Atmungskettenkomplexen laufen unter anderem die β -Oxidation von Fettsäuren und der Citratzyklus in diesem Organell ab. Außerdem finden Schritte anabolischer Prozesse wie der Biosynthese von Lipiden, Aminosäuren und Eisen-Schwefel-Clustern in den Mitochondrien statt. Für die Koordination dieser Stoffwechselwege in Abhängigkeit der Bedingungen ist eine intensive Regulation sowie intrazelluläre Kommunikation notwendig. Während die Adaptation der Genexpression nur verzögert eine Anpassung gewährleistet, könnten posttranslationale Modifikationen von Proteinen wie beispielsweise Phosphorylierungen eine sehr schnelle Regulation ermöglichen.

Den ersten Beweis für die Phosphorylierung eines mitochondrialen (mt) Proteins erbrachten Linn *et al.* im Jahr 1969 durch die Entdeckung der Regulation des Pyruvatdehydrogenase (PDH)-Komplexes in Säugerzellen durch Phosphorylierung dessen E1-Untereinheit [31]. In den folgenden Jahrzehnten gab es durch die Identifizierung und Charakterisierung zahlreicher Signaltransduktionskaskaden viele Belege für die Phosphorylierung cytoplasmatischer bzw. nukleärer Proteine. Eine ähnliche Rolle dieser Modifikation im mt Kompartiment galt hingegen lange als unwahrscheinlich und die Regulation des PDH-Komplexes wurde als Ausnahme betrachtet [16]. Seit den 90er Jahren wächst die Zahl identifizierter mt Phosphoproteine jedoch vor allem aufgrund fokussierter Studien sowie sensitiverer Detektionsmöglichkeiten stetig. Insgesamt wurden bisher mindestens 60 mt Phosphoproteine in verschiedenen eukaryotischen Zellen identifiziert (Überblick in [16]), unter welchen sich Proteine aller Subkompartimente der Mitochondrien fanden. Beispielsweise wird in der Matrix neben der E1-Untereinheit des PDH-Komplexes auch die der „*branched-chain*“ - α -Ketosaure-Dehydrogenase [32] phosphoryliert. Zahlreiche

Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) liegen phosphoryliert vor. So wurden z.B. die 10 kDa-Untereinheit [33] sowie die 42 kDa-Untereinheit [34] des Komplexes I, die Untereinheit IV der Cytochrom c-Oxidase (COX; [35]) sowie Untereinheiten der ATPase [36,37] als Phosphoprotein identifiziert. An der äußeren Mitochondrienmembran (OMM) spielt beispielsweise die Phosphorylierung von BAD (*Bcl-2-associated death promoter*-Protein) eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Apoptose [38].

Des Weiteren wurden in den letzten Jahren in Säugerzellen etwa 25 Kinasen sowie acht Phosphatasen in Mitochondrien bzw. mit ihnen assoziiert identifiziert (Überblick in [16]). Interessanterweise finden sich unter diesen PKasen bzw. PPasen Vertreter nahezu jeder Subfamilie, was einen Einfluss der verschiedensten Signalkaskaden auf die mt Funktion nahe legt.

1.4 Beispiele für die Regulation mitochondrialer Funktionen durch Phosphorylierung in höheren Eukaryoten

Trotz der mittlerweile zahlreichen Kenntnisse über mt Phosphoproteine und putative mt PKasen/PPasen wurden bisher nur für sehr wenige phosphorylierte Proteine der physiologische Hintergrund dieser Modifikation und die involvierten regulatorischen Enzyme identifiziert. Einige in Säugerzellen detaillierter untersuchte Regulationsmechanismen – die Phosphorylierung von BAD, COX sowie des PDH-Komplexes – sollen im Folgenden beispielhaft die Rolle der Phosphorylierung in den verschiedenen Subkompartimenten der Mitochondrien verdeutlichen (Abb. 2).

Ein gut untersuchtes Beispiel für die Modifikation von Proteinen, welche mit der OMM assoziiert sind, ist die Phosphorylierung von BAD durch die Proteinkinase A (PKA; Abb. 2A). Die Kinase liegt inaktiv über AKAP (*A-kinase anchoring protein*) gebunden an der OMM vor, dissoziiert nach cAMP-Bindung von diesem ab und kann anschließend BAD, welches durch Interaktion mit BCL in der OMM verankert ist, an Ser112 phosphorylieren. Dadurch wird BAD freigesetzt, an 14-3-3 im Cytoplasma gebunden und somit inaktiviert [38]. Physiologisch spielt die Bindung zwischen BAD und BCL bei der Induktion der Apoptose eine entscheidende Rolle. Die Phosphorylierung von BAD durch die PKA wirkt aufgrund der Störung dieser Interaktion antiapoptotisch [39].

Ein Beispiel für die Phosphorylierung eines IMM-Proteins stellt die Modifikation der COX dar (Abb. 2B). Diese reduziert als terminaler Enzymkomplex der Atmungskette Sauerstoff zu Wasser und pumpt Protonen durch die innere Membran. In Abhängigkeit der cAMP-Konzentration wird die Untereinheit Cox1 durch eine bisher nicht identifizierte Tyr-Kinase

modifiziert. Die Phosphorylierungsstelle am Cox1 wurde als Tyr304 identifiziert, welches in der Dimerisierungsdomäne der COX im Zwischenmembranraum (IMS) liegt und dessen Modifikation zur Inaktivierung des Komplexes führt [40].

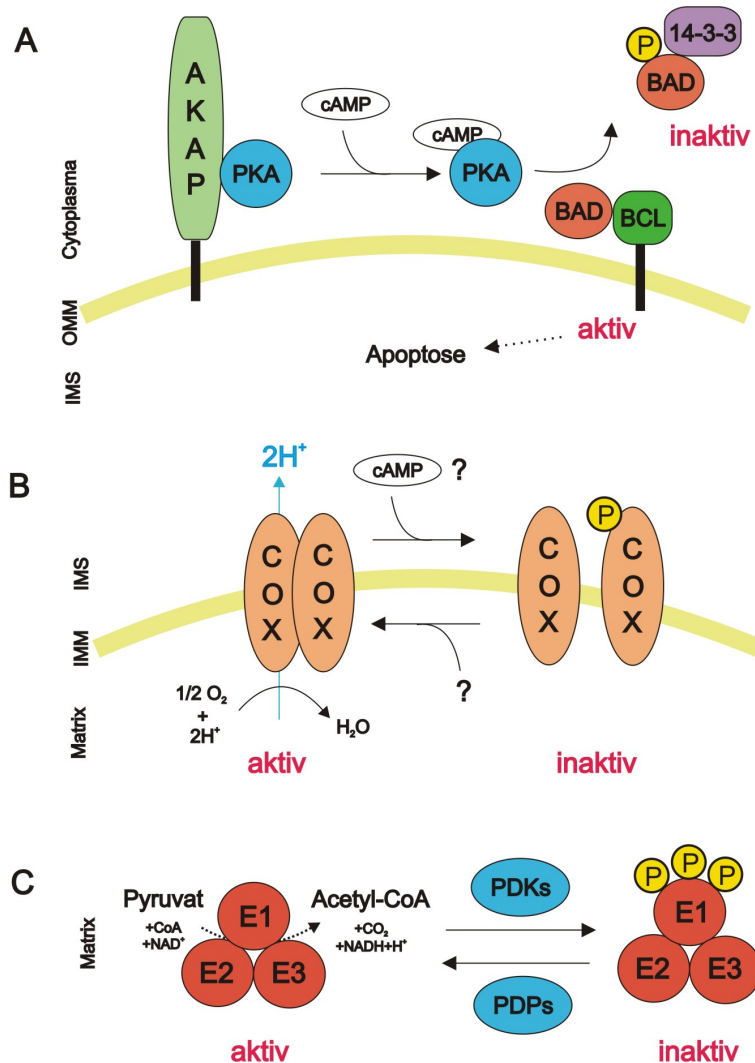


Abb. 2 Die Regulation mt Funktionen durch reversible Phosphorylierung.

Dargestellt sind Beispiele für die Rolle der Proteinphosphorylierung in Säugermitochondrien. Die cAMP-abhängige Phosphorylierung von BAD durch die PKA findet an der äußeren Mitochondrienmembran (OMM) statt (A). Die in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) lokalisierte Cytochrom c-Oxidase (COX) wird durch eine im Zwischenmembranraum (IMS) lokalisierte PKase phosphoryliert und inaktiviert (B). Die Regulation des in der Matrix lokalisierten PDH-Komplexes findet durch reversible Phosphorylierung der E1-Untereinheit durch PDH-Kinasen (PDK) bzw. PDH-Phosphatasen (PDP) statt (C). Die Prozesse sind detailliert im Text erläutert. (Abbildung modifiziert nach [16])

Das am besten untersuchte Beispiel der reversiblen Phosphorylierung in Säugermitochondrien ist der in der Matrix lokalisierte PDH-Komplex (Abb. 2C). Dieser Komplex katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und nimmt damit als Verbindung zwischen Glykolyse und Citratzyklus eine zentrale Rolle im Metabolismus der Zelle ein. Der PDH-Komplex setzt sich aus mehreren Kopien der

katalytischen Untereinheiten E1, E2 und E3 zusammen und zählt mit einem Molekulargewicht von 8-9 MDa in *S.cerevisiae* [41] und 7-10 MDa in Säugerzellen [42] zu den größten bekannten Multienzymkomplexen. Die Regulation des Komplexes erfolgt neben der allosterischen Produkthemmung durch NADH und Acetyl-CoA über die Phosphorylierung von Serinresten der E1-Untereinheit [43,44]. Eine Phosphorylierung durch PDH-Kinasen (PDK) führt dabei zur Inaktivierung des Komplexes, welcher durch die Aktivität von PDH-Phosphatasen (PDP) reaktiviert werden kann (Abb. 2C). Bei Säugern konnten drei Phosphorylierungsstellen an Ser264 (P1), Ser271 (P2) und Ser203 (P3) der α -Untereinheit der E1-Komponente nachgewiesen werden [45]. Im humanen System existieren vier Isoenzyme einer entsprechenden Kinase (PDK1-4) sowie zwei Phosphatasen (PDP1 und 2), welche gewebespezifisch exprimiert werden und über unterschiedliche Affinitäten zu den drei Phosphorylierungsstellen verfügen (Überblick in [46,47]).

1.5 Mitochondriale Proteinphosphorylierung in *S. cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* stellt durch ihre leichte Kultivierbarkeit und die Möglichkeit der vergleichsweise einfachen genetischen Manipulation einen exzellenten eukaryotischen Modellorganismus dar [48]. Aufgrund des fakultativ anaeroben Stoffwechsels eignet sich *S. cerevisiae* insbesondere für die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen, die in die Biogenese und Funktion von Mitochondrien involviert sind. Führen beispielsweise Gendeletionen zu einer Respirationsdefizienz, so ist die Hefe in der Lage ihren Energiebedarf durch Fermentation zu decken und erlaubt damit nachfolgende molekularbiologische Untersuchungen der Mutanten. Ein Großteil der Erkenntnisse bezüglich der mt Biogenese ist auf initiale Untersuchungen in der Hefe zurückzuführen. Des Weiteren konnte eine Reihe humaner Gene, die in den mt Import sowie die Biogenese und Assemblierung der Atmungskettenkomplexe involviert sind, aufgrund ihrer Homologien zu Hefeproteinen bzw. durch heterologe Komplementation der entsprechenden Nullmutanten isoliert werden (z.B. [49-52]).

Für eine Phosphorylierung mt Hefeproteine gab es bis vor wenigen Jahren kaum Belege. Erste Hinweise für die Existenz einer mt cAMP-abhängigen sowie von drei cAMP-unabhängigen Kinasen erbrachten Müller und Bandlow 1987 [53]. Studien mit radioaktiv markiertem ATP zu Beginn der 90er Jahre ließen eine große Anzahl phosphorylierter Proteine in Hefemitochondrien vermuten [54]. Das erste *in vivo* identifizierte mt Phosphoprotein war auch in *S.cerevisiae* die E1 α -Untereinheit des PDH-Komplexes (Pda1p) [44]. Erst in den letzten Jahren konnten durch neue Analysenmethoden sowie fokussierte Organellenproteomics eine größere Anzahl mt Phosphoproteine in der Hefe identifiziert werden. Während in massenspektrometrischen Analysen von Ganzzellextrakten mt

Phosphoproteine kaum vertreten waren [55-57], konnten Reinders *et al.* 2007 [58] in hochreinen Mitochondrien 48 Phosphoproteine und insgesamt 80 verschiedene Phosphorylierungsstellen identifizieren. Bis auf wenige Ausnahmen, die im folgenden Abschnitt aufgeführt werden, sind jedoch die physiologische Bedeutung der Modifikation sowie Enzym-Target-Korrelationen unbekannt.

Prinzipiell ist neben der Regulation von Enzymaktivitäten auch eine Signalübermittlung zwischen Mitochondrien und dem zellulären Umfeld durch Proteinphosphorylierung möglich. Hierfür sind grundsätzlich verschiedene Szenarien der Lokalisierung und Wirkweise von PKasen und PPasen der Hefe denkbar, die in Abbildung 3 beispielhaft für die Kinasen dargestellt sind.

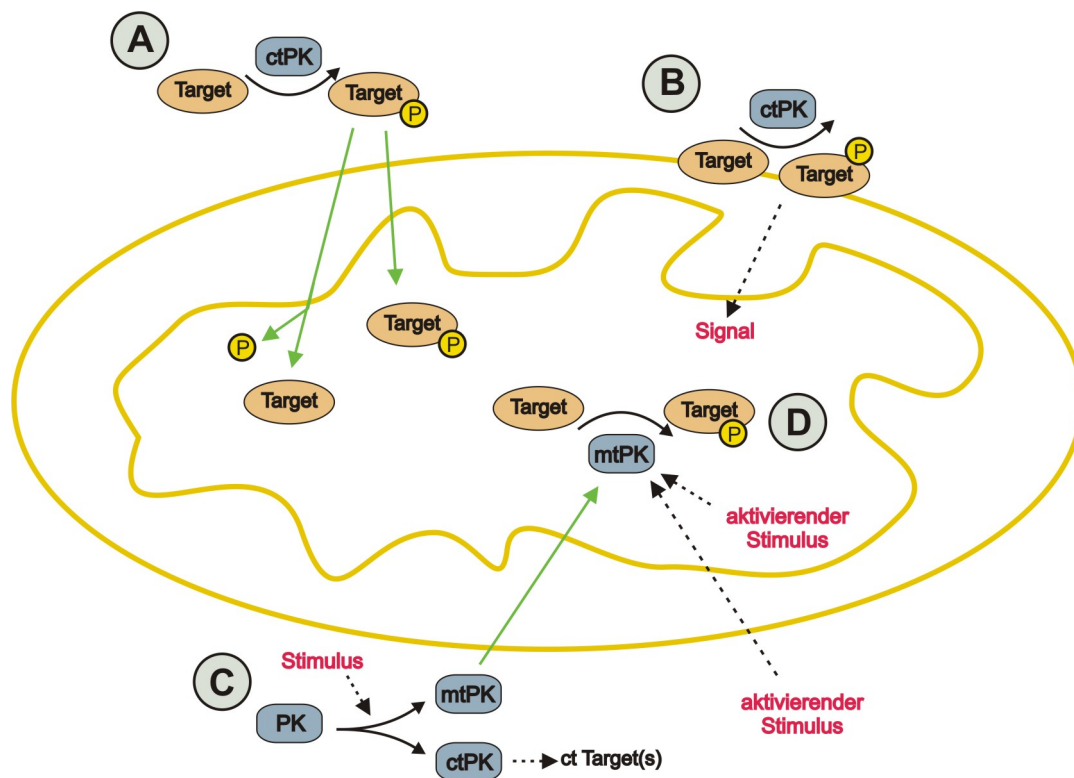


Abb. 3 Putative Signalübermittlungswege in Mitochondrien durch Phosphorylierung.

In der schematischen Darstellung sollen Möglichkeiten der Signalübermittlung in das mt Kompartiment verdeutlicht werden. Eine Phosphorylierung von Targetproteinen (Target) kann durch cytoplasmatische (ct) oder mitochondriale (mt) Proteinkinasen (PK) erfolgen. Grüne Pfeile symbolisieren den Transport von Proteinen ins Mitochondrium. Die verschiedenen putativen Wege (A-D) sowie Beispiele für *S. cerevisiae* sind detailliert im Text erläutert.

Für die phosphorylierungsbasierte Signalweitergabe aus anderen Kompartimenten in das Mitochondrium könnten Targetproteine durch cytoplasmatische PKasen phosphoryliert und anschließend in das Organell transportiert werden (Abb. 3A). Diese Phosphorylierung könnte nach dem Import erhalten bleiben oder im Zuge der Prozessierung abgespalten werden. Für

letzteren Fall, in welchem die Phosphorylierung eine Rolle bei der Vermittlung des Imports spielt, existieren experimentelle Belege in *S. cerevisiae*. Die ATPase-Untereinheit Atp2p besitzt multiple Phosphorylierungen an Ser-, Thr- sowie Tyr-Seitenketten, wobei die stärkste Phosphorylierung an Tyr7 zu finden ist [59]. Dies ist aufgrund der Lage dieses AS-Restes in der N-terminalen mit Lokalisationssequenz, welche nach dem Import abgespalten wird, besonders interessant. In der Tat konnten am maturen Protein nur Ser- und Thr-Phosphorylierungen nachgewiesen werden [60]. Deswegen wurde eine Rolle dieser Tyr-Phosphorylierung am Import von Atp2p postuliert.

Ein weiteres Szenario könnte die Phosphorylierung von Proteinen der OMM durch cytoplasmatische PKasen sein (Abb. 3B), die ihrerseits direkt oder indirekt über Mediatoren das Signal in das Mitochondrium weiterleiten. Bezüglich der Phosphorylierung von OMM-Proteinen durch cytosolische Kinasen wurden erst kürzlich Daten zur Modifikation der Translokase der äußeren Membran (TOM) publiziert [61,62]. Insgesamt konnten 31 Phosphorylierungsstellen an allen TOM-Untereinheiten identifiziert werden [62]. Des Weiteren wurde die Beteiligung zweier cytoplasmatischer Kinasen näher untersucht, wobei für die durch Caseinkinase 2 vermittelte Modifikation eine Rolle bei der Assemblierung der TOM-Komplexe postuliert wurde, während die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A die Translokasefunktion reguliert [61].

Eine direkte regulatorische Funktion der reversiblen Phosphorylierung und damit sehr schnelle Reaktion auf eine Änderung der Bedingungen würde eine Lokalisation der PKase (und PPase) im Mitochondrium voraussetzen (Abb. 3; C+D). Zum einen wäre die Existenz dual lokalisierter Kinasen denkbar, welche neben der Phosphorylierung cytoplasmatischer Targets in Folge bestimmter Stimuli oder Modifikationen in das Mitochondrium transportiert werden und dort auch mit Zielproteinen modifizieren (Abb. 3C). Bisher wurde ein solches Szenario für *S. cerevisiae* jedoch noch nicht in der Literatur beschrieben. Für eine direkte Phosphorylierung im Mitochondrium durch mit PKasen bzw. PPasen, deren Aktivität durch Stimuli aus dem Cytoplasma oder aus dem Mitochondrium selbst reguliert werden könnte (Abb. 3D), wurde bisher auch nur ein Beispiel in der Hefe beschrieben. Eine Verknüpfung zwischen mit lokalisierten regulatorischen Enzymen und Targetprotein konnte erstmals anhand eigener Vorarbeiten für die Kinase Yil042cp und die Phosphatase Yor090cp im Bezug auf die Phosphorylierung von Pda1p postuliert werden [63].

Die bisherigen Daten liefern erste Hinweise auf die Bedeutung der Proteinphosphorylierung in bzw. an den Mitochondrien von *S. cerevisiae*. Die große Anzahl identifizierter Phosphoproteine legt jedoch nahe, dass dieser Regulationsmechanismus an einer Vielzahl weiterer Prozesse beteiligt ist. Fokussierte Studien sind nötig, um weitere Enzym-Target-Korrelationen sowie die physiologische Bedeutung der Phosphorylierungen zu identifizieren.

1.6 Phosphoproteomanalysen und deren Herausforderungen

Experimentelle Untersuchungen der zellulären Phosphorylierungsnetzwerke stellen aufgrund verschiedener Charakteristika eine Herausforderung dar: (i) Die Phosphorylierung ist ein hochdynamischer Prozess, eine Modifikation ist deshalb nur transient vorhanden sowie stark abhängig vom aktuellen Zustand der Zelle („*steady-state*“; [7]). (ii) Während der Probenpräparation der entsprechenden Zellen werden häufig PPasen auch aus anderen Zellkompartimenten freigesetzt, die schnell und effizient Phosphatgruppen von Proteinen abspalten können. Für die Proteinisolation ist deshalb der Einsatz von Phosphataseinhibitoren unerlässlich [4]. Außerdem sind beispielsweise N- oder Acylphosphorylierungen chemisch instabil und bedürfen daher sehr spezieller Analysetechniken [8]. (iii) Nicht zuletzt ist die Phosphorylierung in der Regel eine substöchiometrische Reaktion, weshalb das entsprechende Phosphoprotein in der Zelle gering abundant ist. Des Weiteren sind in einem Gesamtzellansatz phosphorylierte Proteine von Organellen stark unterrepräsentiert. Liegt der Fokus der Untersuchungen auf diesen Phosphorylierungen, ist eine vorherige Dekomplexierung der Probe bzw. eine Reinigung der Kompartimente unbedingt notwendig.

Zur Detektion bzw. Analyse phosphorylierter Proteine finden eine Vielzahl verschiedener Vorgehensweisen Anwendung [4,11,64], von denen ein Überblick in Abb. 4 dargestellt ist. Bei der Durchführung direkter massenspektrometrischen Analysen muss aufgrund des meist geringen Anteils der phosphorylierten Proteinisoformen eine Anreicherung oder eine sehr sensitive Markierung phosphorylierter Proteine erfolgen. Letzteres kann beispielsweise durch radioaktives ^{32}P [65] oder durch die Verwendung stabiler AS-Isotope (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*; SILAC; [66]) erreicht werden. Bei der Anreicherung phosphorylierter Proteine/Peptide finden am häufigsten Affinitätschromatographien Anwendung, bei welchen die Spezifität der Bindung von Phosphoproteinen an Titandioxid [67] oder an Metallionen wie Fe^{3+} und Ga^{3+} (*immobilized metal ion chromatographie*; IMAC; [68]) genutzt wird. Des Weiteren kann eine Anreicherung beispielsweise auch mittels Immunopräzipitationen (Verwendung spezifischer Phosphoantikörper) oder chemischen Modifikationen (z.B. Phosphateliminierung) durchgeführt werden (Überblick in [4,69]).

Die Detektion phosphorylierter Proteine nach der Separation im Gel kann durch die Verwendung spezifischer Fluoreszenzfärbungen erfolgen (z.B. „*Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain*“). Der wohl größte Vorteil dieser Methode gegenüber der traditionellen radioaktiven Markierung ist die Möglichkeit der Analyse der nativen „*steady-state*“-Phosphorylierung von Proteinen durch Direktfärbung im Gel [34]. Einschränkend muss jedoch hinzugefügt werden, dass durch die direkte Bindung des Farbstoffes an Phosphat

auch Proteine, die z.B. ATP gebunden haben, detektiert werden könnten [70] sowie häufig eine vergleichsweise starke Hintergrundfärbung zu verzeichnen ist [71].

Für die Detektion phosphorylierter Proteine in Western Blot-Analysen können phosphospezifische Antikörper verwendet werden. Während Antikörper, die gegen das Phosphopeptid eines bestimmten Proteins oder P-Tyr gerichtet sind, sehr spezifisch sind, weisen P-Ser- und P-Thr-Antikörper aufgrund des wenig strukturierten Epitops eine geringe Spezifität auf [72].

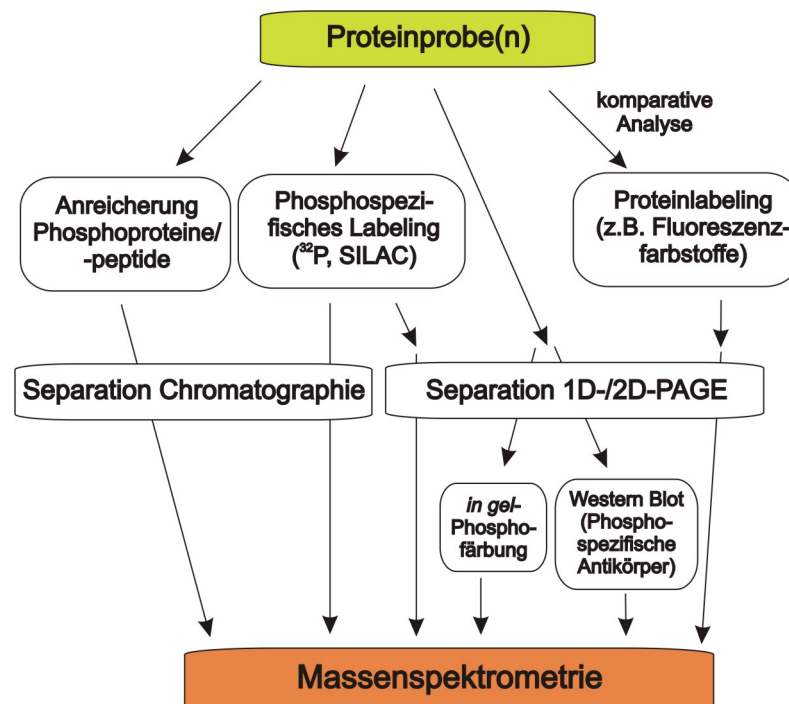


Abb. 4 Schematische Darstellung verschiedener Vorgehensweisen zur Analyse von Phosphoproteomen.

Phosphoproteine können nach spezifischer Anreicherung (z.B. IMAC) oder phosphospezifischem Labeling mit radioaktiven (^{32}P) bzw. stabilen (SILAC) Isotopen untersucht werden. Die Separation der Proben erfolgt mittels Chromatographie (z.B. LC) oder im Gel (1D/2D-PAGE). In komparativen Analysen (z.B. Phosphatase-Behandlung, Analyse verschiedener Mutanten) werden Proteine ggf. vor der Separation markiert. Nicht-markierte Proben können nach dem Gellauf durch Phospho-Färbungen oder gegen phosphorylierte Aminosäuren gerichtete Antikörper visualisiert werden. Die finale Analyse bzw. Identifikation erfolgt in der Regel massenspektrometrisch.

Für die Separation von komplexen Proteomen im Polyacrylamidgel ist eine eindimensionale (1D) SDS-PAGE nur bedingt geeignet. Häufig kommt eine zweidimensionale (2D) Elektrophorese zum Einsatz, bei welcher die isoelektrische Fokussierung (IEF) und eine hochauflösende SDS-PAGE kombiniert werden [73]. Diese Methode erlaubt meist auch ohne spezifische Markierung eine Analyse posttranslationaler Modifikationen [74], da diese in der Regel zu einer Veränderung des pI-Wertes und/oder Molekulargewichts des Proteins führen. So hat zum Beispiel eine Phosphorylierung durch die zusätzlichen negativen Ladungen einen niedrigeren pI-Wert und in manchen Fällen durch eine Veränderung der Konformation

auch ein abweichendes Migrationsverhalten in der SDS-PAGE zur Folge. In komparativen Studien – beispielsweise der vergleichenden Analyse verschiedener Mutantenstämme oder von Proben vor und nach einer Phosphatasebehandlung – können die Proteinproben auch mittels unterschiedlicher Farbstoffe (z.B. Fluoreszenzfarbstoffe wie Cydyes) vor dem Gellauf markiert werden. Diese sogenannte „*difference gel electrophoresis*“ (DIGE; [75]) ermöglicht außerdem eine sehr sensitive und genaue Quantifizierung der verschiedenen Proteinspots. Alle bisher aufgeführten Nachweismethoden liefern jedoch lediglich Hinweise für die Phosphorylierung eines Proteins. Die Identifikation des Phosphoproteins sowie der Modifikationsstelle erfolgt in der Regel mittels sensitiver Massenspektrometrie (MS)-Methoden (Überblick in [4,59,64]).

Nach der Identifizierung zahlreicher phosphorylierter Proteine in den letzten Jahren sind insbesondere deren physiologische Bedeutung sowie die Enzym-Target-Korrelation der involvierten regulatorischen Proteine in den Fokus aktueller Untersuchungen gerückt. Aufgrund der geringen Abundanz der PKasen und PPasen sowie der zumeist transienten Anwesenheit stellt auch deren Untersuchung eine große Herausforderung dar.

1.7 Zielstellung der Arbeit

Die Phosphorylierung von Proteinen ist eine der bedeutendsten posttranslationalen Modifikationen in Eukaryoten. Kenntnisse zur Rolle dieser Modifikation in der Hefe *S. cerevisiae* basieren überwiegend auf Untersuchungen des cytoplasmatischen bzw. des nukleären Kompartimentes. Während die Zahl identifizierter mt Phosphoproteine in den letzten Jahren stetig stieg, existieren nur wenige Daten hinsichtlich der physiologischen Bedeutung sowie der regulatorisch wirkenden Enzyme in den Mitochondrien, die im Fokus dieser Arbeit liegen.

Anhand bioinformatischer Analysen soll eine Liste von PKasen und PPasen mit putativer mt Lokalisation erstellt werden, von welchen zehn Kandidaten für initiale Analysen ausgewählt werden. Nach der Etablierung und Optimierung der Separationsbedingungen für die 2D-IEF/SDS-PAGE sollen sich komparative DIGE-Proteomanalysen anschließen. Dafür sollen hochreine Mitochondrien der entsprechenden Deletionsmutanten und des Wildtyps (WT) präpariert, markiert und mittels 2D-Gelelektrophorese separiert werden. Entsprechende Proteinspots mit signifikanten Änderungen in den Mutantenstämmen sollen mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

Ausgehend von diesen Analysen fokussiert sich die weitere Arbeit auf Untersuchungen zur Regulation des mt PDH-Komplexes. Die subzelluläre Lokalisation der putativen PDH-Kinasen und -Phosphatasen soll unter Verwendung Epitop-getaggtter Varianten verifiziert werden. Des Weiteren soll die physiologische Bedeutung der Proteine durch eine Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Deletionsstämme sowie PDH-Aktivitätsmessungen analysiert werden. Der Phosphorylierungszustand von Pda1p soll nach Separation durch 2D-IEF-PAGE detailliert untersucht und die Modifikationsstelle durch massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert werden. Im Folgenden sollen Doppeldeletionsstämme der putativen PDH-PKasen bzw. -PPasen generiert werden, für welche sich ebenso Proteomanalysen nach Separation mittels 2D-PAGE sowie PDH-Aktivitätsanalysen anschließen sollen. Die native „Blue Native“(BN)-PAGE kombiniert mit einer zweiten Dimension (SDS-PAGE) soll genutzt werden, um Untersuchungen hinsichtlich der molekularen Organisation der identifizierten regulatorischen Enzyme durchzuführen. Dieselbe Methode soll auch Anwendung bei der Analyse der Organisation des PDH-Komplexes in Abhängigkeit der Anwesenheit der PKasen bzw. PPasen finden. Final sollen Interaktionsanalysen für die putativen PDH-Kinasen durchgeführt werden.

Im letzten Teil der Arbeit soll ein inverser Ansatz durch Verwendung einer Überexpressionsmutante genutzt werden, um Hinweise auf die physiologische Rolle der PKase Sat4p zu erhalten. Zunächst soll die intrazelluläre Lokalisation des Proteins untersucht sowie Analysen der Protein-Isoformen durchgeführt werden. Nach der Generierung einer *TET*-Überexpressionsmutante sollen komparative DIGE-Analysen des mt Proteoms durchgeführt werden. Ausgewählte Proteinspots und insbesondere putative posttranslational modifizierte Proteine sollen detailliert mittels MS analysiert werden. Die detektierten Auswirkungen der Überexpression von Sat4p auf Proteomebene sollen durch entsprechende Aktivitätsmessungen mt Enzymkomplexe komplettiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zentrifugen

Tisch-Kühlzentrifuge 1-15K	Sigma
Tisch-Zentrifuge 1-14	Sigma
Ultrazentrifuge Optima Max	Beckman Coulter
Zentrifuge 3K30	Sigma
Zentrifuge Avanti J-20	Beckman Coulter

2.1.2 Feinchemikalien

6-Aminocapronsäure	Sigma Aldrich
Acrylamid/Bisacrylamid (BN-PAGE)	Sigma Aldrich
Acrylamid/Bisacrylamid (SDS-PAGE)	Roth, Applichem
AEBSF	Applichem
Agarose	Biozym
Ampicillin	Roth
APS	Merck, GE Healthcare
ATP	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Serva
CHAPS	GE Healthcare
CoA	Sigma Aldrich
Coomassie® Brillantblau G250 (Serva blue)	Serva
Desoxycholsäure	Sigma Aldrich
De-Streak Reagenz	GE Healthcare
Digitonin	Sigma Aldrich
DMF	Sigma Aldrich
dNTP-Mix	New England BioLabs
Dodecylmaltosid	Sigma Aldrich
DTT	Applichem, GE Healthcare
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich
G418 (Geneticin)	Applichem
Glycin	Applichem, GE Healthcare
Harnstoff	GE Healthcare
Heringssperma-DNA	Invitrogen
Imidazol	Fluka
Iodoacetamid	Sigma Aldrich, GE Healthcare
NAD ⁺	Sigma Aldrich
NADH	Sigma Aldrich

NBT	Sigma Aldrich
PEG 3350	Sigma Aldrich
Pharmalyte™ pH 3-10	GE Healthcare
Phosphatase-Inhibitor Cocktail I +II	Sigma Aldrich
PMS	Sigma Aldrich
Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-frei)	Roche
Pyruvat	Sigma Aldrich
SDS	Applichem, GE Healthcare
TEMED	Applichem, GE Healthcare
Thioharnstoff	GE Healthcare
TPP	Sigma Aldrich
Tris	Applichem, GE Healthcare
Tris(2-carboxyethyl)phosphine	Sigma Aldrich
Triton X-100	Roche
β-Mercaptoethanol	Roth, Applichem

2.1.3 Verbrauchsmaterial und Kit-Systeme

96-well Mikrotiterplatten	TPP, Greiner
<i>breathe-easy</i> Membran (gaspermeabel)	Roth
Calmodulin Sepharose 4B	GE Healthcare
<i>D_C</i> - Protein Assay	Biorad
ECL ^{plus} - System™	GE Healthcare
Gel Blotting Papier	Whatman
Glasperlen (Ø 0,2-0,45 mm)	Roth
IgG-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare
Immobilon™- PVDF-Membran (ø 0,45 µm)	Millipore
Invisorb Fragment clean up Kit	InViTek
Invisorb Spin Plasmid Mini Kit	InViTek
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	Genomed
NHS HP Spin Trap™	GE Healthcare
Nucleospin Plasmid Quickpure	Macherey-Nagel
Röntgenfilme	GE Healthcare

2.1.4 Plasmide

Plasmid	Marker	Quelle
pCM225 (<i>tetO₇</i>)	<i>KanMX</i> (G418)	[76]
pUC19HA (<i>3HA-URA</i>)	<i>KIURA3</i> (komplementiert <i>ura3</i>)	W. Zachariae, MPI-B Martinsried
pWZV108 (<i>3HA-HIS</i>)	<i>SpHis5⁺</i> (komplementiert <i>his3</i>)	W. Zachariae, MPI-B Martinsried

2.1.5 Oligonukleotide

Folgende Primer wurden von der Firma Biomers bzw. Eurofins MWG Operon bezogen. Unterstrichene Bereiche (in den zur Amplifikation der Integrationskassetten genutzten Primer) sind homolog zu Sequenzen der verwendeten Plasmide.

HA-tagging von *PDA1* (Plasmid pWZV108 (3HA-HIS))

Nr.	Primer	DNA- Sequenz (5' → 3')
#1	PDA1fortag	TACTTGGGACTTCAAAAAGCAAGGTTTTGCCTCTAGGGAT <u>TCCGGTTCTGCTGCTAG</u>
#2	PDA1revtag	CGATCACAGCACTATTATTTTATTTTTCCTTACGATTTAAI <u>ACGACTCACTATAGGG</u>
#3	PDA1chkfor	GTT TGT CGC ACC TGT ATC
#4	PDA1chkrev	AAA ATG GCG CTT CCA GGG
#5	SpHIS5for	TTT GGA CAA AGC TCC CTT ACC
#6	SpHIS5rev	ACA ACA CTC CCT TCG TGC TTG

HA-tagging von *YGL059w* (Plasmid pUC19HA (3HA-URA))

Nr.	Primer	DNA- Sequenz (5' → 3')
#7	YGL059wfortag	ATGAAGCATACGAAGAACTACAATTAGATAAAGTGTCGG <u>GTTCTGCTGCTAG</u>
#8	YGL059wrevtag	GAAATGTAGTCACCATACTAATATTCCGAATATGTATCCTC <u>GAGGCCAGAAGAC</u>
#9	YGL059chkfor	CAATGCCTGGATATGGTACC
#10	YGL059chkrev	CCTTTTTGTATATACATACAC
#11	URA3KLfor	GCAGGTGGCTATTAG
#12	URA3KLrev	ATGGTCTGATATCAC

TET- Promotor- Replacement von *SAT4* (Plasmid pCM225)

Nr.	Primer	DNA- Sequenz (5' → 3')
#13	SAT4-S1For	AACTAGTAGTAAGTATTGTGACTACTATTCCCTGTAATCAC <u>AGCTGAAGCTTCGTACGC</u>
#14	SAT4-S2Rev	GCTGAGGAATAGCGGCATTATTATCATTCATACCAGTCAT <u>ATAGGCCACTAGTGGATCTG</u>
#15	Sat4chkPromfor	GGTAGCTTTCTAATATTAGG
#16	Sat4chkNtermrev	CTTTCCTGCCTAGATGATC
#17	KANfor	CTCACATCACATCCGAAC
#18	KANrev	GAGAAACTCACCGAGGCA

Überprüfung korrekter Kreuzungsprodukte zur Herstellung der Doppeldeletionsstämme $\Delta pkp1+2$ ($\Delta yil042c/\Delta yg1059w$) bzw. $\Delta ppp1+2$ ($\Delta yor090c/\Delta ycr079w$)

Nr.	Primer	DNA- Sequenz (5' → 3')
#19	YIL042chkrev	AGCCAGTTGAATGCATAC
#20	YOR090cchkrev	CACGTATGAGGTGACAAG
#21	YCR079chkrev	GTATACATACTAATAAAAGG

Für die Überprüfung der Integration der *kanMX*- Kasette wurden des Weiteren die bereits oben aufgeführten Primer #10, #17 und #18 verwendet.

2.1.6 Enzyme

AcTEV-Protease	Invitrogen
<i>Combi</i> Polymerase	InVitek
<i>Phusion</i> Polymerase	New England BioLabs
Proteinase K	Roth
Ribonuklease A	Roth
Taq- Polymerase	Peqlab, New England BioLabs
Zymolyase 20T	MP Biomedicals, Seikagaku Corp.
λ -Phosphatase	New England BioLabs

2.1.7 Größenstandards

DNA

λ -DNA <i>EcoRI/HindIII</i> geschnitten	Fermentas
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas

Protein (SDS-PAGE)

BenchMark™ prestained	Invitrogen
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas

Protein (BN bzw. CN-PAGE)

High Molecular Weight Calibration kit	GE Healthcare
---------------------------------------	---------------

2.1.8 Antikörper

Die Verdünnung der Antikörper zur Verwendung in Western Blot-Analysen erfolgte in 5 % Magermilch in 1x TBS/T.

Antikörper primär	Quelle	Verdünnung
mouse-anti-cMyc	Roche	1 : 1000
mouse-anti-HA	Roche	1 : 1000
mouse-anti-Cox2p	Invitrogen	1 : 500
mouse-anti-Pgk1p	Invitrogen	1 : 500
mouse-anti-Dpm1p	Invitrogen	1 : 1000
rabbit-anti-Aco1p	R. Lill, Marburg	1 : 2000
rabbit-anti-Cyb2p	W. Neupert, München	1 : 2000
rabbit-anti-Ccp1p	W. Neupert, München	1 : 1000
rabbit-anti-Cit1p	T. Fox, Ithaca	1 : 1000
rabbit-anti-TAP	Open Biosystems	1 : 2000

Antikörper sekundär	Quelle	Verdünnung
sheep-anti-mouse IgG-HRP	GE Healthcare	1 : 5000
donkey-anti-rabbit IgG-HRP	GE Healthcare	1 : 5000

2.1.9 *E. coli* - Stämme

Als Wirtsstämme für Vektoren wurden die *E. coli* - Stämme DH5 α bzw. TOP10 verwendet.

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYAargF</i>)U169	BRL
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

2.1.10 *S. cerevisiae* – Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
BY4741 (WT)	MAT a, <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0	Euroscarf Acc.No. Y00000
BY4742	MAT α , <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>lys2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0	Euroscarf Acc.No. Y10000
KL14-4a	MAT a, <i>his1</i> , <i>trp2</i> , [<i>rho</i> ⁰]	[77]
IL993-5c	MAT α , <i>ilv5</i> , [<i>rho</i> ⁰]	[77]
Δ <i>yil042c</i> (Δ <i>pkp1</i>)	BY4741, MAT a, <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0, <i>YIL042c::kanMX4</i>	Euroscarf Acc.No. Y01435
Δ <i>ygl059w</i> (Δ <i>pkp2</i>)	BY4741, MAT a, <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0, <i>YGL059w::kanMX4</i>	Euroscarf Acc.No. Y04426
Δ <i>yor090c</i> (Δ <i>ppp1</i>)	BY4741, MAT a, <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0, <i>YOR090c::kanMX4</i>	Euroscarf Acc.No. Y01866

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>Δycr079w (Δppp2)</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YCR079w::kanMX4	Euroscarf Acc.No. Y05798
<i>Δyhr076w (Δptc7)</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YHR076w::kanMX4	Euroscarf Acc.No. Y01904
<i>Δycr008w (Δsat4)</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YCR008w::kanMX4	Euroscarf Acc.No. Y03488
<i>Δycr091w (Δkin82)</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YCR091w::kanMX4	Euroscarf Acc.No. Y05810
<i>Δyol045w (Δpsk2)</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YOL045w::kanMX4	Euroscarf Acc.No. Y01736
<i>Δygr052w (Δfmp48)</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YGR052w::kanMX4	Euroscarf Acc.No. Y04682
<i>Δydl230w (Δptp1)</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YDL230w::kanMX4	Euroscarf Acc.No. Y03927
<i>Δpda1</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YER178w::kanMX4	Euroscarf Acc.No. Y06174
<i>Δpkp1 α</i>	BY4742, MAT α, <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> , YIL042c::kanMX4	Euroscarf Acc.No. Y11435
<i>Δppp1 α</i>	BY4742, MAT α, <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> , YOR090c::kanMX4	Euroscarf Acc.No. Y11866
<i>Δpkp1+2 (Δyil042c / Δygl059w)</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YIL042c::kanMX4, YGL059w::kanMX4	diese Arbeit
<i>Δppp1+2 (Δyor090c / Δycr079w)</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YOR090c::kanMX4, YCR079w::kanMX4	diese Arbeit
PDA1-HA	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; YER178w::(YER178w-3HA-Sphis5 ⁺)	[78]
<i>Δpkp1/PDA1-HA</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YIL042c::kanMX4; YER178w::(YER178w-3HA-Sphis5 ⁺)	[78]
<i>Δpkp2/PDA1-HA</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YGL059w::kanMX4; YER178w::(YER178w-3HA-Sphis5 ⁺)	diese Arbeit
<i>Δppp1/PDA1-HA</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YOR090c::kanMX4; YER178w::(YER178w-3HA-Sphis5 ⁺)	[78]
<i>Δppp2/PDA1-HA</i>	BY4741, MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> , YCR079w::kanMX4; YER178w::(YER178w-3HA-Sphis5 ⁺)	diese Arbeit
Pkp1-TAP	MAT a, <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; YIL042c::(YIL042c-TAP-HIS3MX6)	Open Biosystems Acc.No. YSC1178-7501003

Stamm	Genotyp	Quelle
Pkp1-cMyc	MAT a, <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YIL042c::(<i>YIL042c</i> -cMyc- <i>Sphis5</i> ⁺)	[79]
Pkp2-HA	MAT a, <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YGL059w::(<i>YGL059w</i> -3HA- <i>Sphis5</i> ⁺)	[80]
Ppp1-HA	MAT a, <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YOR090c::(<i>YOR090c</i> -3HA- <i>Sphis5</i> ⁺)	[78]
Ppp2-HA	MAT a, <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YCR079w::(<i>YCR079w</i> -3HA- <i>Sphis5</i> ⁺)	[80]
YHR076w-cMyc	MAT a, <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YHR076w::(<i>YHR076w</i> -cMyc- <i>Sphis5</i> ⁺)	[79]
Pkp1-TAP/ Pkp2-HA	MAT a, <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YIL042c::(<i>YIL042c</i> -TAP- <i>HIS3MX6</i>); YGL059w::(<i>YGL059w</i> -3HA-KIURA3)	diese Arbeit
Pkp1-cMyc / Pkp2-HA	MAT a, <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YIL042c::(<i>YIL042c</i> -cMyc- <i>Sphis5</i> ⁺); YGL059w::(<i>YGL059w</i> -3HA-KIURA3)	diese Arbeit
Sat4-cMyc	MAT a, <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YCR008w::(<i>YCR008w</i> -cMyc- <i>Sphis5</i> ⁺)	[81]
Tet-Sat4	MAT a, <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YCR008w::(<i>kanMX4-tetO</i> ₇ - <i>YCR008w</i> -cMyc- <i>Sphis5</i> ⁺)	diese Arbeit

2.1.11 Kultivierungsmedien

Die verwendeten Medienkomponenten wurden von der Firma FORMEDIUM bezogen. Ausnahmen waren NaCl (Roth) sowie die MM-Supplemente (Roth bzw. Sigma Aldrich).

2.1.11.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung der *E. coli* - Stämme DH5α und TOP10 wurde in LB-Medium durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm geschüttelt.

LB-Medium

Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Pepton	1,0 % (w/v)
NaCl	1,0 % (w/v)
Agar (Festmedium)	2,0 % (w/v)
pH-Wert auf 7,4 einstellen	

Zur Selektion von Transformanten wurde dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/l) zugesetzt.

2.1.11.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte in der Regel bei 30 °C im Vollmedium mit Glukose als C-Quelle (YPD). Flüssigkulturen wurden auf dem Schüttler bei 150 – 200 rpm inkubiert. Für die Präparation von Mitochondrien wurden die Stämme in YPE in 5 l - Kulturkolben mit Schikanen (Schott) kultiviert. Die Selektion von Transformanten erfolgte auf Minimalmedium mit den entsprechenden Supplementen.

Vollmedium (YP)

Hefeextrakt	1,00 % (w/v)
Pepton	2,00 % (w/v)
Agar (Festmedium)	1,50 % (w/v)

Nach dem Autoklavieren wurde dem YP-Medium die entsprechende Kohlenstoffquelle (C-Quelle) in der angegebenen Konzentration hinzugefügt:

YPD	Glukose	2 % (w/v)
YPG	Glycerin	2 % (w/v)
YPE	Ethanol	3 % (v/v)

Die Selektion von geneticinresistenten Transformanten (Marker *kanMX*) erfolgte auf YPD-Platten mit G418 (Endkonzentration 0,5 g/l). Für phänotypische Charakterisierungen salzsensitiver Stämme wurden YPD-Platten ggf. mit 1 M NaCl versetzt.

Minimalmedium (MM)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50 % (w/v)
YNB	0,17 % (w/v)
Glukose	2,00 % (w/v)
Agar (Festmedium)	2,50 % (w/v)

Zu dem Minimalmedium wurden die entsprechenden Supplemente in folgenden Konzentrationen gegeben:

Aminosäure / Nucleobase	Konzentration
L-Histidin	60 mg/l
L-Leucin	80 mg/l
L-Lysin	30 mg/l
L-Methionin	20 mg/l
Uracil	30 mg/l

2.2 Genetische Methoden

2.2.1 Kreuzung von *S. cerevisiae* - Stämmen, Sporulation und Tetradenanalyse

Die Herstellung der Doppeldeletionsmutanten $\Delta pkp1+2$ ($\Delta yil042c/\Delta ygl059w$) sowie $\Delta ppp1+2$ ($\Delta yor090c/\Delta ycr079w$) erfolgte durch Kreuzung entsprechender Einzelmутanten entgegengesetzten Paarungstyps und anschließender Sporulation in Flüssigmedium.

Dazu wurde eine Suspension der haploiden Ausgangsstämme 1:1 vermischt, auf eine YPD-Platte getropft und nach dem Trocknen über Nacht (üN) bei 30 °C inkubiert. Die Selektion von Diploiden erfolgte anschließend für 4-6 Tage auf MM ohne Lysin und Methionin.

Für die Sporulation wurden die Diploiden zunächst üN in 5 ml YPD bei 25 °C kultiviert und durch Zentrifugation bei 1.200 x g für 5 min geerntet. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 5 ml sterilem dH₂O und einmal mit Sporulationsmedium gewaschen. Die Zellen wurden abschließend in 5 ml Sporulationsmedium aufgenommen und für 4-5 Tage bei 25 °C inkubiert.

Für die Tetradenanalyse wurden 200 µl dieser Kultur abzentrifugiert (5 min, 1.200 x g), mit 1 ml sterilem dH₂O gewaschen und in 100 µl dH₂O resuspendiert. Die Ascushülle wurde durch die Zugabe einer Zahnstocherspitze Zymolyase 20T und 10-minütiger Inkubation bei 30 °C angedaut. Anschließend wurde der Ansatz auf eine YPD-Platte (in der „search area“ des Mikromanipulators) aufgebracht. Die Vereinzelung der Sporen erfolgte mittels Mikro-manipulator (Singer MSM System).

Sporulationsmedium:	1 % (w/v)	Kaliumacetat
	9,9 mg/l	L-Adenin
	9,6 mg/l	Uracil
	9,6 mg/l	L-Lysin
	9,9 mg/l	L-Leucin
	9,6 mg/l	Tryptophan
	9,6 mg/l	L-Histidin

2.2.2 Analyse der *rho*⁰-Bildungsrate bei *S. cerevisiae*

Die Analyse der *rho*⁰-Bildungsrate erfolgte durch Langzeitinkubation über etwa eine Woche und tägliche Analyse des Anteils atmungskompetenter Zellen.

Der zu untersuchende Stamm wurde in 10 ml YPD für 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde eine neue Kultur (10 ml YPD) 1:500 mit der ersten Kultur inokuliert und ebenfalls für 24 h inkubiert. Dieses Vorgehen wurde für insgesamt sieben Tage wiederholt. Dabei wurden täglich 100 µl einer 10⁵ Verdünnung der üN Kulturen auf YPD-Platten ausgespatelt und bis

zum Erscheinen von Kolonien bei 30 °C inkubiert. Die Atmungskompetenz wurde anschließend durch die Wachstumsanalyse der Kolonien auf YPG-Platten (*replica plating*) untersucht. Parallel zu dem zu analysierenden Stamm wurde der Wildtyp als Referenzstamm in gleicher Weise behandelt. Der Anteil der Kolonien, die nicht mehr in der Lage waren auf YPG zu wachsen, ergab die ermittelte ρ^0 -Bildungsrate/Zeit.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Charakterisierung des Wachstums von *S. cerevisiae* - Stämmen

2.3.1.1 Analysen auf Festmedium

Entsprechende Hefestämme wurden üN in YPD kultiviert und die OD₆₀₀ in einer 1:10 Verdünnung bestimmt. Anschließend wurde eine serielle Verdünnung hergestellt, wobei davon ausgegangen wurde, dass in der Hefekultur bei einer OD₆₀₀ von 0,1 etwa 10⁶ Zellen pro ml enthalten sind. Es wurden vier Verdünnungsstufen hergestellt, bei denen in je 8 µl 10⁴, 10³, 10² bzw. 10¹ Zellen enthalten sind. Diese 8 µl wurden nebeneinander auf die entsprechenden Festmedien aufgetropft, die Platten nach dem Trocknen der Tropfen bei 30 °C für 2-4 Tage inkubiert und anschließend fotografisch dokumentiert.

2.3.1.2 Analysen in Flüssigkultur (Nephelometer)

Für die Aufnahme von Wachstumskinetiken wurde die Zunahme der Lichtstreuung in Flüssigkulturen mit dem Nephelometer („NEPHELOstar“, BMG Labtech) verfolgt.

Zunächst wurde von den zu analysierenden Stämmen eine Vorkultur (in YPD) üN bei 30 °C inkubiert, eine zweite Vorkultur mit der ersten inokuliert (1:100) und wiederum üN bei 30 °C geschüttelt. Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmungen in 96-*well* Platten, welche mit einer gaspermeablen Membran (*breathe easy* Membran) verschlossen wurden. Pro *well* wurden 200 µl des entsprechenden Mediums mit 10⁴ Zellen der zweiten Vorkultur inokuliert. Parallel wurden Medienproben (ohne Zellen) gemessen, welche für die Berechnungen als Blindwerte abgezogen wurden. Die Messung erfolgte im Nephelometer in 20 min-Intervallen während der Inkubation bei 30 °C und konstantem Schütteln bei 150 rpm (3 mm Auslenkung).

2.3.2 Amplifikation von Plasmiden in *E. coli*

Benötigte Plasmide wurden in *E. coli* transformiert, vermehrt, anschließend isoliert und für die PCR-Amplifikation verschiedener Integrationskassetten genutzt.

2.3.2.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurden 400 ml LB-Medium 1:100 mit einer entsprechenden üN-Kultur inokuliert. Diese Kultur wurde bei 37 °C inkubiert bis sie eine OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,8 erreicht hatte. Die Zellen wurden auf Eis für 15-30 min gekühlt und anschließend zentrifugiert (4.000 x g, 4 °C, 15 min). Das Waschen der Zellen erfolgte zweimal mit jeweils 400 ml eiskaltem sterilen Wasser und 10 % (v/v) Glycerin. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert, auf Eis aliquotiert (50 µl) und bei -80 °C gelagert.

2.3.2.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

50 µl elektrokompetenter *E. coli* -Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 0,5-1 µg Plasmid-DNA gemischt und in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette (Biorad) überführt. Anschließend wurde mit Hilfe des „Gene Pulser II“ (Biorad) ein Impuls (25 µF, 200 Ω, 2,5 kV) ausgelöst. Die Entladungsdauer zwischen den Kondensatorplatten sollte 4,5 bis 5,0 ms betragen. Die Zellen wurden sofort in 1 ml SOC-Medium resuspendiert, in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB_{amp}-Festmedium ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium:	10,0 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10,0 mM	MgCl ₂
	10,0 mM	MgSO ₄
	20,0 mM	Glukose
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	2,0 % (w/v)	Trypton

2.3.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mit dem „Invisorb Spin Plasmid Mini Kit“ (InViTek) bzw. „Nucleospin Plasmid Quickpure“ (Macherey & Nagel) nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

2.3.3 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.3.3.1 Diagnostische PCR

Die Standard-PCR wurde zur Verifizierung der korrekten Integration in das Genom von *S. cerevisiae* durch die Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche verwendet. Als Template

wurde DNA (vgl. 2.3.5) der jeweiligen Transformanden verwendet und die Reaktion nach folgendem Schema angesetzt:

Komponenten	Eingesetzte Volumina (µl)
10x Puffer	5
MgCl ₂ (50 mM)	2,5
Template (genomische DNA)	1-2
dNTP-Mix (10 mM)	1
forward-Primer (100 pmol/µl)	1
reverse-Primer (100 pmol/µl)	1
RibonukleaseA (10 mg/ml)	0,1
Taq- Polymerase (5 U/µl)	0,5
ddH ₂ O	ad 50 µl

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen in einem Thermocycler („Primus25“ (Peqlab) bzw. „Primus96plus“ (MWG Biotech)) durchgeführt:

Initialdenaturierung	: 94 °C	5 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	: 94 °C	30 s	
Annealing	: primerabhängig [†]	1 min	
Elongation	: 72 °C	1-2 min [‡]	
finale Elongation	: 72 °C	5 min	

[†] Die benötigte Annealingtemperatur eines Primers lässt sich aufgrund seines GC-Gehaltes (Anteil der organischen Basen Guanin und Cytosin in Prozent) und seiner Länge in Basenpaaren (PL) näherungsweise durch folgende Formel berechnen:

$$T_a = 64,3^{\circ}\text{C} + 0,41 \times \text{GC\%} - 650/\text{PL}$$

[‡] Die zu wählende Elongationszeit ist nicht nur abhängig von der Länge des Amplifikates, sondern auch von der verwendeten Polymerase. Die verwendete Taq- Polymerase amplifiziert etwa 1.000 bp/min.

2.3.3.2 Amplifikation von Integrationskassetten mittels SFH-PCR

Die *short flanking homology*-PCR (SFH-PCR, [82]) wurde zur Amplifikation der Integrationskassetten zum *Epitop-tagging* verwendet, wobei die Plasmide pWZV108 (3HA-HIS) bzw. pUC19HA (3HA-URA) als Template verwendet wurden. Des Weiteren wurde die TET-Kassette zum Promotor *replacement* mittels SFH-PCR amplifiziert (Template pCM224 (*tetO*₂)). Die verwendeten Primer (siehe 2.1.5) weisen 3'-seitig einen komplementären Bereich zu flankierenden Sequenzen der Integrationskassette auf und sind 5'-seitig komplementär zur Integrationsstelle im Genom.

Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

Komponenten	Eingesetzte Volumina (µl)
10x Puffer	10
MgCl ₂ (50 mM)	5
Template (Plasmid)	1
dNTP-Mix (10 mM)	2
forward-Primer (100 pmol/µl)	1
reverse-Primer (100 pmol/µl)	1
Polymerase (5 U/µl) [†]	0,5
ddH ₂ O	ad 100 µl

[†] Für die SFH-PCR wurde die *Combi* Polymerase bzw. die *Phusion* Polymerase verwendet, welche beide *proof reading* – Aktivität besitzen.

Die 2 Stufen-PCR wurde unter folgenden Bedingungen in einem Thermocycler („Primus25“ (Peglab) bzw. „Primus96plus“ (MWG Biotech)) durchgeführt:

Initialdenaturierung	:	94 °C	5 min	
Denaturierung	:	94 °C	30 s	} 10 Zyklen
Annealing	:	49 °C	1 min	
Elongation	:	72 °C	2 min	
Denaturierung	:	94 °C	30 s	} 20 Zyklen
Annealing	:	55 °C	1 min	
Elongation	:	72 °C	2-3 min	
finale Elongation	:	72 °C	5 min	

2.3.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Die hocheffiziente Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach dem Protokoll von Gietz *et al.* [83]. Pro Transformationsansatz wurden 5 ml YPD mit einem entsprechenden Volumen einer üN-Kultur zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angeimpft und bis zu einer Zellzahl von 2x10⁷ Zellen/ml (entspricht etwa einer OD₆₀₀ von 2) bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 3.500 x g für 5 min pelletiert, mit 1 ml dH₂O und anschließend mit 1 ml 100 mM LiAc gewaschen. Die Heringsspermien-DNA wurde für 5 min bei 100 °C denaturiert (ssDNA) und unverzüglich auf Eis gestellt.

Zu dem Zellpellet wurden in angegebener Reihenfolge folgende Komponenten zugegeben:

PEG 3350 (50% w/v)	240 µl
LiAc (1 M)	36 µl
ssDNA (10µg/ml)	10 µl
DNA (PCR-Ansatz)	x µl (max. 74 µl)
dH ₂ O	ad 360 µl

Der Ansatz wurde gut vermischt, ein Hitzeschock bei 42 °C für 40 min durchgeführt und die Zellen anschließend durch eine kurze Zentrifugation (15 s, max. Geschwindigkeit) pelletiert. Erfolgte die Selektion von Transformanten durch Auxotrophiemarker (*URA*, *HIS*), wurde das Pellet in 100 µl dH₂O aufgenommen und auf Selektionsmedien (MM-Platten mit den entsprechenden Supplementen) ausplattiert. Bei der Selektion auf eine Geneticinresistenz (*kanMX*) wurden die Zellen zunächst in 5 ml YPD aufgenommen und für 3 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert, in 100 µl dH₂O resuspendiert und auf YPD-Festmedium mit G418 (Endkonzentration 0,5 g/l) ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30 °C.

2.3.5 Isolierung von DNA aus *S. cerevisiae*

Die isolierte genomische DNA wurde als Template einer diagnostischen PCR (siehe 2.3.3.1) zur Überprüfung der korrekten Integration von *Tagging*- bzw. Deletionskassetten verwendet.

2.3.5.1 Minipräparation genomischer DNA

Für die Minipräparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wurden die Zellen einer 10 ml üN-Kultur (YPD) für 5 min bei 3.500 x g geerntet. Nach einem Waschschrift mit 1 ml dH₂O wurde das Pellet in 500 µl Lysispuffer aufgenommen und zu ca. 400 µl Glasperlen in einem frischen Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Das Gemisch wurde 2 min kräftig gevortext und auf Eis inkubiert, bis die Glasperlen sedimentiert waren. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 275 µl 7 M Ammoniumacetat pH 7,0 versetzt. Anschließend erfolgte zuerst eine Inkubation für 5 min bei 65°C und danach für 5 min auf Eis. Nachfolgend wurden 500 µl Chloroform zugeben und die Phasen gründlich gemischt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 13.000 x g wurde die obere Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch die Zugabe von 1 ml Isopropanol und anschließender Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur (RT). Das Pellet wurde nach einer Zentrifugation für 5 min bei 13.000 x g mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet (Speedvac, Eppendorf) und abschließend in 50 µl dH₂O aufgenommen.

Lysispuffer:	100 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	50 mM	EDTA
	1 % (w/v)	SDS

2.3.5.2 Schnelle Präparation einer DNA- Rohfraktion („Kolonie- PCR“)

Diese modifizierte Methode lieferte deutlich zuverlässigere Ergebnisse als die klassische Kolonie-PCR, bei welcher die Hefezellen direkt zum PCR- Ansatz gegeben wurden. Für die Isolation einer DNA-Rohfraktion wurde eine Hefekolonie einer frischen Platte (max. 1 Woche alt) zu 30 µl 0,2 % (w/v) SDS gegeben, für 15 s gevortext und anschließend für 4 min bei 90 °C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min, max. Geschwindigkeit) wurde 1 µl des Überstandes als Template für eine diagnostische PCR verwendet.

2.3.6 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in 0,8 oder 1 %igen (w/v) Agarose-Gelen im konstanten elektrischen Feld. Die Agarose wurde in der Mikrowelle in 1x TBE-Puffer gelöst und nach einer kurzen Abkühlzeit mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,1 µg/ml) versetzt. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 6x DNA-Ladepuffer (Endkonzentration 1x) versetzt. Der Elektrophoreselauf erfolgte in 1x TBE bei einer Spannung von 80-120 V. Die Gele wurden unter UV-Licht im „Alpha Imager“ (Alpha Innotech) dokumentiert.

TBE (10x):	108 g	Tris
	55 g	Borsäure
	3,72 g	EDTA
	ad 1 l	dH ₂ O
DNA-Ladepuffer (6x):	10 mg	Bromphenolblau
	1,0 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	1,7 ml	87 % (v/v) Glycerol
	ad 5 ml	dH ₂ O

2.3.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden entsprechende DNA-Banden unter langwelligem UV-Licht (302 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus den Gelblöckchen erfolgte mit dem „JETQUICK Gel Extraction Spin Kit“ (Genomed) oder dem „Invisorb Fragment clean up Kit“ (InViTek) nach Angaben der Hersteller.

2.3.8 Bestimmung der DNA-Konzentration (UV-Absorptionsmessung)

In einer Mikro-Quarzküvette wurde von 50-100 μl dH_2O ein kontinuierliches Absorptionsspektrum von 230-340 nm aufgenommen, welches das Referenzspektrum für die folgenden Messungen lieferte. Von der isolierten DNA wurde in einer geeigneten Verdünnung (in dH_2O) ebenfalls ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Bei einer OD_{260} von 1 enthält die Lösung 50 μg DNA/ml Lösung.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Präparation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Für die Isolation von Mitochondrien aus Hefezellen gibt es unterschiedliche Methoden, welche sich im Wesentlichen durch die eingesetzten Kulturvolumina, die Art des Zellaufschlusses sowie der Reinheit der präparierten Mitochondrien unterscheiden. Um den Phosphorylierungszustand der Proteine weitestgehend zu erhalten, wurden Phosphataseinhibitoren während der Präparationen hinzugefügt.

2.4.1.1 Mechanische Präparation

Die zu untersuchenden Stämme wurden zunächst in 5 ml YPD für etwa 8 h kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur (20 ml YPD bzw. 50 ml YPE) angeimpft und üN bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden bei 3.500 x g für 5 min geerntet und mit 1 ml dH_2O gewaschen. Das Pellet wurde auf Eis mit 500 μl MTE-Puffer und 400 μl Glasperlen vermischt. Der Zellaufschluss erfolgte für 5 min entweder durch kräftiges Vortexen oder in der Schwingmühle MM200 (Retsch) bei einer Frequenz von 20/s. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, die Glasperlen mit 500 μl MTE-Puffer gewaschen und die Überstände vereint. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 3.500 x g und 4 °C wurde der Überstand erneut für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die cytoplasmatische Fraktion (ÜS) wurde abgenommen und das Mitochondrienpellet in 50 μl MTE-Puffer resuspendiert.

MTE-Puffer:	650 mM	Mannitol
	20 mM	Tris/HCl (pH 7,6)
	1 mM	EDTA
	1 mM	AEBSF (frisch zusetzen)
	1x	PI- Mix (frisch zusetzen)
	1:1000	Phosphataseinhibitoren I+II (frisch zusetzen)

2.4.1.2 Enzymatische Präparation

Die enzymatische Isolation von Mitochondrien erfolgte nach dem Protokoll von Daum *et al.* [84]. Zur Präparation wurden in der Regel 2 l Medium (YPD oder YPE) in einem 5 l-Kulturkolben mit Schikanen verwendet. Die Hauptkultur wurde mit einer entsprechenden Vorkultur 1:20 (YPE) bzw. 1:100 (YPD) beimpft und üN bei 30 °C und 110 rpm inkubiert.

Die Zellernte erfolgte in der frühen stationären Phase durch Zentrifugation (3.500 x g, 5 min, RT). Die Zellen wurden mit etwa 250 ml dH₂O gewaschen und das Zellnassgewicht (ZNG) bestimmt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 30 °C in Puffer A (2 ml/g ZNG). Nach zweimaligem Waschen mit je etwa 250 ml Puffer C erfolgte die Sphäroplastierung mit Zymolyase für 45-50 min bei 30 °C in Puffer B (7 ml/g ZNG). Die Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (3.500 x g, 5 min, 4 °C) pelletiert und mit ca. 250 ml eiskaltem Puffer C gewaschen. Der Aufschluss erfolgte in 10 ml Puffer D durch 20-30x Pottern mit einem Dounce-Homogenisator (15 ml, Wheaton). Das Homogenat wurde zentrifugiert (3.500 x g, 5 min, 4 °C) und der Überstand gesammelt. Mit dem verbleibenden Pellet wurde der Zellaufschluss zwei- bis dreimal wiederholt. Die gesammelten Überstände (ca. 30-40 ml) wurden bei 12.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und die cytosolische Fraktion (ÜS) abgenommen. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer D resuspendiert und bei 3.500 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer und Zellkerne zu entfernen. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und die Mitochondrien bei 12.000 x g für 10 min und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde abschließend in 100-300 µl Puffer D oder SEM- Puffer (siehe 2.4.1.3) aufgenommen und ggf. bei -80 °C gelagert.

Puffer A:	100 mM	Tris/SO ₄ ²⁻ (pH 9,4)
	1,54 mg	DTT pro ml Puffer A (frisch zusetzen)
Puffer B:	1,2 M	Sorbitol
	20 mM	KPP _i -Puffer (pH 7,4)
	0,3 mg	Zymolyase pro ml Puffer B (frisch zusetzen)
Puffer C:	1,2 M	Sorbitol
Puffer D:	0,65 M	Sorbitol
	10 mM	Tris/HCl (pH 7,4)
	1 mM	AEBSF (frisch zusetzen)
	1x	PI- Mix (frisch zusetzen)
	1:500	Phosphataseinhibitoren I+II (frisch zusetzen)

2.4.1.3 Reinigung der Mitochondrien durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation und NaCl- Behandlung

Für 2D-Experimente, Enzymassays sowie Lokalisationsstudien schloss sich an die enzymatische Präparation der Mitochondrien eine Reinigung an, um die Mitochondrien von assoziiertem ER und Cytoplasma zu trennen. Die Gradientenzentrifugation erfolgte nach Meisinger *et al.* [85]. Dafür wurden die Mitochondrien am Ende der Präparation in 100 µl SEM-Puffer aufgenommen, auf den vorbereiteten Saccharose- Gradienten gegeben und für 60 min bei 134.000 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Der Gradient wurde auf Eis in 5 ml Ultrazentrifugenröhrchen nach folgenden Angaben geschichtet, wobei sich die höchste Konzentration am Boden befindet:

0,86 ml 60 % Saccharose (w/v) in EM-Puffer,
 2,30 ml 32 % Saccharose (w/v) in EM-Puffer,
 0,86 ml 23 % Saccharose (w/v) in EM-Puffer,
 0,86 ml 15 % Saccharose (w/v) in EM-Puffer.

Nach der Zentrifugation wurden die Mitochondrien vorsichtig aus der 60%/32% Zwischenschicht abpipettiert und mit dem 2-fachen Volumen an SEM-Puffer verdünnt. Anschließend wurden die Organellen durch eine Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x *g* und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde erneut in 100-200 µl SEM-Puffer resuspendiert, auf einen frischen Gradienten gegeben und für 60 min bei 134.000 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden wieder aus der Zwischenschicht gewonnen, erneut pelletiert und in Puffer D aufgenommen bzw. einer NaCl-Behandlung unterzogen.

Mit Hilfe der Hochsalzbehandlung können periphere Proteine, welche über ionische Wechselwirkungen mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert sind, entfernt werden. Dafür wurden die Gradienten-gereinigten Mitochondrien in 500 µl 1 M NaCl (in Puffer D, siehe 2.4.1.2) aufgenommen und 20-30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 12.000 x *g*, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit je 1 ml Puffer D gewaschen. Abschließend wurden die Mitochondrien in 200-300 µl Puffer D resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

EM-Puffer:	1 mM	EDTA
	10 mM	MOPS (pH7,2)
SEM-Puffer:	250 mM	Saccharose
	1 mM	EDTA
	10 mM	MOPS (pH7,2)
	1 mM	AEBSF (frisch zusetzen)
	1x	PI- Mix (frisch zusetzen)
	1:100	Phosphataseinhibitoren I+II (frisch zusetzen)

2.4.2 Proteinase K-Behandlung von Mitochondrien und Mitoplasten

Für eine Proteinase K-Behandlung wurden stets frische, enzymatisch präparierte Mitochondrien verwendet. Zur Generierung von Mitoplasten wurde ein Aliquot der Mitochondrien (in Puffer D) durch Zugabe von 10 mM Tris/HCl (pH 7,4) verdünnt, um eine Endkonzentration von 0,1 M Sorbitol einzustellen, und 30 min auf Eis inkubiert. Die Mitoplasten wurden anschließend durch die Zugabe eines Volumens Puffer D (Endkonzentration 0,375 M Sorbitol) stabilisiert.

Jeweils 50 µg Mitochondrien bzw. Mitoplasten (jeweils in Puffer D) wurde mit 0,5 µg/µl Proteinase K (gelöst in Puffer D) in An- bzw. Abwesenheit von 1 % (v/v) Triton X-100 für 15 min auf Eis inkubiert. Die Proteasebehandlung wurde durch Zugabe von 2 mM AEBSF gestoppt. Die Proben wurden nach Zentrifugation (20.000 x g, 10 min, 4 °C) in 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS- PAGE und Western Blot analysiert. Proben, welche mit Triton X-100 lysiert wurden, wurden zuvor mit TCA präzipitiert (vgl. 2.4.5.1).

2.4.3 Gesamtproteinextraktion

Die Isolation von Gesamtzellprotein erfolgte durch ein modifiziertes Protokoll der mechanischen Mitochondrienpräparation (siehe 2.4.1.1). Entsprechende üN-Kulturen wurden geerntet, mit dH₂O gewaschen, und in 500 µl MTE-Puffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte nach Zugabe von Glasperlen in der Schwingmühle MM200 (Retsch) für 5 min bei max. Frequenz. Nach einer Zentrifugation bei 3.500 x g für 5 min bei 4 °C konnte der Überstand als Gesamtproteinextrakt verwendet werden.

2.4.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen (in der Regel in Dreifachbestimmung) erfolgte mit dem „D_C- Protein Assay“ (Biorad) nach den Angaben des Herstellers. Für das Erstellen einer Eichkurve wurde Rinderserumalbumin verwendet.

2.4.5 Fällung von Proteinen aus Lösungen

2.4.5.1 TCA-Fällung

Für eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) wurden die Proteinlösungen mit 100 % TCA zu einer Endkonzentration von 10 % versetzt und bei -20 °C üN inkubiert. Danach wurden die Proteine durch Zentrifugation bei 20.000 x g und 4 °C für 30 min pelletiert und zweimal mit jeweils ca. 800 µl eiskaltem 80 % (v/v) Aceton gewaschen. Anschließend wurde das

Pellet unter Vakuum für 10 min getrocknet (Speedvac, Eppendorf) und in entsprechendem Puffer resuspendiert.

2.4.5.2 Methanol-Chloroform Fällung (nach Wessel & Flügge, 1984)

Eine weitere, sehr schnelle und effiziente Methode zur Fällung von Proteinen aus Lösungen stellt die Methanol-Chloroform Fällung nach Wessel & Flügge [86] dar. Vorteilig ist hierbei, dass im Gegensatz zur TCA-Fällung weitestgehend alle posttranslationalen Modifikationen der Proteine (insbesondere säurelabile Phosphorylierungen) erhalten bleiben.

Zu fällende Proteinlösungen (150 µl) wurden mit 600 µl Methanol und anschließend mit 150 µl Chloroform versetzt und kräftig gevortext. Nach Zugabe von 450 µl dH₂O erfolgte eine Zentrifugation für 1 min (max. Geschwindigkeit, RT). Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, ohne dabei die Interphase zu zerstören. Anschließend wurden 450 µl Methanol zugegeben, kräftig gevortext und für 2 min (max. Geschwindigkeit, RT) zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde für etwa 10 min luftgetrocknet und abschließend in dH₂O oder 1x Laemmli-Probenpuffer (siehe 2.4.9) gelöst.

2.4.6 λ-Phosphatasebehandlung

Für jede Probe wurden 50 µg Gesamtprotein oder Mitochondrien mittels Methanol-Chloroform (siehe 2.4.5.2) gefällt. Die Protein-Dephosphorylierung wurde in 20 µl-Ansätzen durchgeführt, welche 1x Phosphatasepuffer (NEB) und 1 mM MnCl₂ enthielten. Zu den Proben wurde jeweils 1 µl λ-Phosphatase (NEB) gegeben und die Ansätze in An- bzw. Abwesenheit von Phosphatase-Inhibitoren I+II (1:100) für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Laemmli-Probenpuffer (Endkonzentration 1x) versetzt und die Reaktion durch Denaturierung für 5 min bei 95 °C gestoppt.

2.4.7 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation wurde mit dem „NHS HP Spin Trap“- Kit (GE Healthcare) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für die Präzipitation wurden 40 µg HA- bzw. cMyc-Antikörper kovalent an die „Spin trap“-Matrix gebunden. Die Lyse von 1 mg enzymatisch präparierten Mitochondrien erfolgte in BN-Lysepuffer mit 4 % Digitonin (siehe 2.4.13.2) für 15 min auf Eis. Alle Schritte erfolgten in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren (1 mM AEBSF, 1x PI- Mix) sowie Phosphatase-inhibitor-Cocktail I+II (1:100). Nach intensiven Waschschritten wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von 2 % (w/v) SDS eluiert.

2.4.8 Tandem-Affinitätsreinigung (TAP-Methode)

Durch die *Tandem affinity purification* (TAP-Methode) können Proteine, welche mit einem entsprechenden Epitop-tag fusioniert wurden, sowie mit ihnen interagierende Proteine durch zwei hoch affine Reinigungsschritte isoliert werden. In dieser Arbeit wurde diese Methode im Wesentlichen nach dem Protokoll von Puig *et al.* [87] durchgeführt.

Für die TAP-Methode wurden zunächst 1 mg Mitochondrien pelletiert (12.000 x g, 10 min, 4 °C) und in 100 µl TAP- Puffer mit 1 % (w/v) Digitonin für 20 min auf Eis lysiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 18.000 x g und 4 °C wurde das Lysat mit 900 µl TAP-Puffer verdünnt und auf 50 µl äquilibrierte IgG-Agarose (GE Healthcare) gegeben. Die Bindung erfolgte für 2 h bei 4 °C unter Rotation auf dem Drehrad. Nach dreimaligem Waschen mit TAP-Puffer fand der TEV-Verdau in 500 µl TAP-Puffer (ohne PI-Mix) mit 0,1 % Digitonin, 1 mM DTT und 5 µl AcTEV-Protease (Invitrogen) für 1,5 h bei 18 °C statt. Für den zweiten Affinitätsschritt wurden 100 µl Calmodulin-Sepharose 4B (GE Healthcare) sowie 4 µl CaCl₂ (1 M), 0,5 µl Mg-acetat (1 M) und 0,4 µl β-Mercaptoethanol (14,2 M) zum Überstand gegeben und für 2 h bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Sepharose mit TAP-Puffer erfolgte die Elution mit Laemmli-Probenpuffer (Endkonzentration ~1x). Die Proteine des Überstandes wurden mittels Methanol-Chloroform Fällung (siehe 2.4.5.2) präzipitiert

Alle Proben für die SDS-PAGE wurden mit Laemmli-Probenpuffer ohne reduzierendes Agens (DTT) versetzt und nicht bei 95 °C denaturiert, um eine Dissoziation der schweren und leichten Kette der IgGs zu vermeiden. Stattdessen erfolgte eine 15- minütige Inkubation bei RT vor dem Laden der Proben auf ein SDS- Gel.

TAP-Puffer:	10 mM	NaCl
	5 mM	6-Aminocaprinsäure
	50 mM	Imidazol (pH 7,0)
	1 mM	AEBSF (frisch zusetzen)
	1x	PI- Mix (frisch zusetzen)
	1:100	Phosphataseinhibitoren I+II (frisch zusetzen)

2.4.9 SDS-PAGE

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde die Methode der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli [88] verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte in kleinen Elektrophoreseapparaturen (9,0 x 7,0 x 0,75 cm) der Firma Hoefer oder in breiteren Kammern (16,0 x 7,0 x 0,75 cm) von Peqlab mit einem 12 %, 10 % oder 7,5 %igen Trenngel und einem 4 %igen Sammelgel. Für die zweite Dimension der BN-PAGE (2.4.13.4) wurde ein 12 %iges und 8 %iges Trenngel verwendet. Die zweite Dimension der IEF/SDS-

PAGE erfolgte in 12 %igen Trenngelen in der *EttanDaltSix*-Apparatur (GE Healthcare). Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 6x Laemmli-Probenpuffer versehen (Endkonzentration 1x) und - wenn nicht anders angegeben - für 5 min bei 95 °C denaturiert. Der Gellauf erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 120 V.

	Trenngel				Sammelgel
	12 %	10 %	8 %	7,5 %	4 %
Acrylamidlösung	4,00 ml	3,33 ml	2,60 ml	2,50 ml	0,65 ml
ddH ₂ O	3,35 ml	4,02 ml	4,75 ml	4,85 ml	3,05 ml
Trenngelpuffer	2,50 ml	2,50 ml	2,50 ml	2,50 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	-	1,25 ml
10% (w/v) SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
10% (w/v) APS	50 µl	50 µl	100 µl	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	20 µl	5 µl	5 µl
Gesamtvolumen	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	5 ml

Acrylamidlösung 30 %:	29 % (w/v) Acrylamid / 1 % (w/v) Bisacrylamid	
Trenngelpuffer:	1,5 M	Tris/HCl (pH 8,0)
Sammelgelpuffer:	0,5 M	Tris/HCl (pH 6,8)
Elektrodenpuffer (1x):	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
Laemmli-Probenpuffer (6x):	0,3 M	Tris/HCl (pH 6,8)
	10 % (w/v)	SDS
	30 % (v/v)	Glycerin
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	100 mM	DTT (frisch zusetzen)

2.4.10 Western Blot

Nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon™-P, Millipore) mittels *semi dry*- oder *tank*- Western Blot transferiert.

Das Gel wurde vor dem Zusammenbau des Blots für 10-15 min in 1x Transferpuffer äquilibriert. Die Membran wurde kurz in Methanol getaucht und anschließend zusammen mit dem Filterpapier in Transferpuffer gelegt. Auf die Anode der Blotapparatur (*semi-dry*: Peqlab, *tank*: Biorad) wurden luftblasenfrei zuerst drei Lagen Filterpapier, die Membran, das SDS-Gel und abschließend drei Lagen Filterpapier gelegt und die Blotapparatur geschlossen. Der Transfer mittels *semi-dry* Blots erfolgte für 1 h bei 25 V, wobei sich die angelegte Stromstärke nach folgender Formel berechnete: Stromstärke [mA] = Fläche des SDS- Gels [cm²] x 1,5 mA/cm². Der Transfer mittels *tank* Blot erfolgte für 30 min bei 4 °C, 100 V und 350 mA.

Transferpuffer (1x):	192 mM	Tris
	25 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol
	0,01 % (w/v)	SDS

2.4.11 Immunologische Detektion

Nach dem Transfer wurde die Membran in Blockierungslösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS/T) für 1 h bei RT oder üN bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran unter Schütteln für 1 h mit dem primären Antikörper bei RT inkubiert und danach 3 x 10 min mit 1x TBS/T gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper für 30-45 min bei RT. Abschließend wurde die Membran erneut für 3 x 10 min in 1x TBS/T gewaschen.

Die Detektion wurde mit Hilfe des „ECL^{plus}-SystemsTM“ (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine Quantifizierung der Signale erfolgte ggf. mit der „ImageQuantTL“-Software (GE Healthcare).

TBS/T (1x):	20 mM	Tris/HCl (pH 7,6)
	137 mM	NaCl
	0,1 % (v/v)	Tween 20

2.4.12 „Stripping“ und Reprobing von PVDF-Membranen

Um eine Membran mit weiteren Antikörpern inkubieren zu können, mussten zuerst bereits gebundene Antikörper entfernt werden. Dafür wurde die Membran für 30 min bei 55-60 °C im „Stripping“-Puffer unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit 1x TBS/T gewaschen. Danach konnte die Membran blockiert und mit einem neuen Antikörper inkubiert werden.

„Stripping“-Puffer:	62,5 mM	Tris/HCl (pH 6,7)
	2 % (w/v)	SDS
	100 mM	β-Mercaptoethanol (frisch zusetzen)

2.4.13 BN/CN-PAGE

Die „Blue-Native“ (BN)- bzw. „Clear-Native“ (CN)- Polyacrylamid-Gelelektrophorese eignet sich zur nativen Separation funktioneller Enzymkomplexe. Die BN-PAGE wurde im Wesentlichen nach dem Protokoll von Schagger *et al.* [89,90], die CN-PAGE nach Wittig *et al.* [91] durchgeführt. Da der PDH-Komplex unter den Standard-Pufferbedingungen mit

vergleichsweise hohen Salzkonzentrationen instabil ist [92], wurden die Protokolle für die Separation dieses Komplexes modifiziert („Niedrigsalz-Puffer“, [78]).

Die Proteinkomplexe wurden nach der Lyse der Mitochondrien elektrophoretisch in einem Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Gel für eine Aktivitätsfärbung verwendet oder es schloss sich eine SDS-PAGE (zweite Dimension) an, durch welche sich die nativ getrennten Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten separieren lassen.

2.4.13.1 Gießen eines Gradientengels

Das Gießen des Gradientengels erfolgte mit Hilfe eines Gradientenmischers mit zwei Sammelgefäßen (SG15 für 15 ml, Hoefer), einem Rührer und einer Pumpe (Peristaltikpumpe ISM 857D, Ismatec). Es wurden Elektrophoresekammern der Firma GE Healthcare (*mini VE complete*) verwendet.

In dieser Arbeit wurden 3-13%ige Gradientengele (mit 3 bzw. 2,5 %igen Sammelgelen) verwendet, die auf Eis nach folgendem Schema hergestellt wurden:

	Trenngel		Sammelgel	
	3 %	13 %	3 %	2,5 %
Acrylamidlösung	0,375 ml	1,625 ml	0,375 ml	0,3125 ml
3x Gelpuffer	1,67 ml	1,67 ml	1,67 ml	1,67 ml
Glycerin	-	1 g (0,8 ml)	-	-
ddH ₂ O	ad 5 ml			
10% (w/v) APS	20 µl	10 µl	25 µl	25 µl
TEMED	2 µl	1 µl	5 µl	5 µl
Gesamtvolumen	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

Für das Gießen des Gels wurden jeweils 3,25 ml der 13 %igen und 3 %igen Gellösung in das entsprechende Sammelgefäß des Gradientenmischers gegeben. Bei der Pumpe wurden folgende Parameter eingestellt: 1x Pumpleistung und Geschwindigkeitsstufe 10 (Pumpgeschwindigkeit ca. 750 µl/min). Nach dem Auspolymerisieren des Gradientengels wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt.

Acrylamidlösung:	40 % (w/v)	Acrylamid N,N-Methylen-bis-acrylamid
3x Gelpuffer „Niedrigsalz“:	150 mM	6-Aminocaprinsäure
	75 mM	Imidazol, pH 7,0

2.4.13.2 Probenvorbereitung (Lyse)

Für die Analysen wurden je 200 µg enzymatisch präparierte Mitochondrien pelletiert (10 min, 12.000 x g, 4°C) und in 12 µl Lysispuffer und 8 µl Digitoninlösung (Verhältnis

Detergenz:Protein 4:1) resuspendiert. Nach der Inkubation für 10 min auf Eis wurde die Probe für 10 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4 µl Ladepuffer versehen und auf das Gel aufgetragen.

Lysispuffer „Niedrigsalz“:	10 mM	NaCl
	5 mM	6-Aminocaprinsäure
	50 mM	Imidazol, pH 7,0
	1 mM	AEBSF
	1x	PI-Mix
	1:100	Phosphatase- Inhibitor Cocktail I+II
Digitoninlösung:	10 % (w/v)	Digitonin (in Lysispuffer aufnehmen und 5 min bei 100 °C kochen)
Ladepuffer:	0,01 % (w/v)	Ponceau S
	5 % (v/v)	Glycerin

2.4.13.3 Elektrophoresebedingungen

Die Elektrophoresekammer wurde zur Kühlung in eine mit Eis gefüllte Styroporbox gestellt und mit Anodenpuffer und BN-Kathodenpuffer A bzw. CN-Kathodenpuffer gefüllt. Der Gellauf wurde bei 30 V gestartet und nach einer Stunde bei 100-120 V (oder bei 20 V üN) fortgesetzt. Bei der BN wurde Kathodenpuffer A gegen Kathodenpuffer B ersetzt, sobald die Lauffront des Ladepuffers etwa die Hälfte des Gels erreicht hatte.

BN-Kathodenpuffer A:	50 mM	Tricin
	7,5 mM	Imidazol pH 7,0
	0,02 % (w/v)	Serva-blue G-250
BN-Kathodenpuffer B:	50 mM	Tricin
	7,5 mM	Imidazol pH 7,0
	0,002 % (w/v)	Serva-blue G-250
CN-Kathodenpuffer:	50 mM	Tricin
	7,5 mM	Imidazol pH 7,0
	0,05 % (w/v)	Desoxycholsäure
	0,01 % (w/v)	Dodecylmaltosid
Anodenpuffer:	25 mM	Imidazol/HCl, pH 7,0

2.4.13.4 Zweite Dimension

Die zweite Dimension erfolgte in Form einer modifizierten SDS-PAGE (vgl. 2.4.9). Dafür wurden die einzelnen Spuren der ersten Dimension mit einem Skalpell ausgeschnitten, für 30-40 min im SDS-Puffer inkubiert und anschließend kurz mit dH₂O gespült. Die Gelstreifen wurden waagerecht zwischen die Glasplatten für die SDS-PAGE gelegt und die Gießapparatur nach Anleitung des Herstellers aufgebaut. Bis zu einer Höhe von ca. 1 cm

unterhalb des Gelstreifens wurde das 12 %ige Trenngel eingefüllt und mit ddH₂O überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das ddH₂O entfernt und bis etwa 2-3 mm unterhalb des Gelstreifens 8 %iges Trenngel („Spacergel“) gefüllt, welches ebenso mit ddH₂O überschichtet wurde. Nach Polymerisation dieses Geles wurde der Gelstreifen vorsichtig luftblasenfrei auf die Gelkante geschoben. Abschließend wurde das Wasser entfernt, der Gelstreifen mit 1%iger Agarose (in 1x SDS-Elektrodenpuffer, 2.4.9) eingebettet und die Elektrophorese unter den bereits beschriebenen Bedingungen (siehe 2.4.9) durchgeführt.

SDS-Puffer:	1 % (w/v)	SDS
	1 mM	AEBSF
	20 µl	0,5 M TCEP
	ad 10 ml	ddH ₂ O (immer frisch herstellen)

2.4.14 2D-DIGE

Die zweidimensionale IEF/SDS-PAGE zählt zu den hochauflösenden Separationstechniken in der Proteinbiochemie. Sie eignet sich auch zur Trennung von Protein-Isoformen, welche sich z.B. durch eine posttranslationale Modifikation unterscheiden. Die Methode der *difference gel electrophoresis* (DIGE) schließt dabei ein vorheriges Markieren der Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy2, Cy3, Cy5) ein und erlaubt eine parallele Separation dieser Proben in einem Gel („*Multiplexing*“) sowie eine optimale Quantifizierung der Spots. Insbesondere werden falschpositive Ergebnisse durch technische Fehler reduziert, da „Gel-zu-Gel“-Unterschiede durch die Verwendung eines internen Standards minimiert werden. Dieser Standard setzt sich aus einer Mischung aller im Experiment untersuchten Proben zusammen und wird auf jedem Gel als Cy2-markierte Probe mit separiert.

Die Methode der 2D-IEF/SDS-PAGE wurde im EttanDALTSix-System der Firma GE Healthcare und im Wesentlichen nach den Protokollen von Görg *et al.* [73] sowie dem Nutzerhandbuch „2-D Electrophoresis“ (GE Healthcare) durchgeführt.

2.4.14.1 Lyse von Mitochondrien und Markierung mit CyDyes (DIGE)

Für die 2D-Gelelektrophorese ohne eine vorherige Fluoreszenzmarkierung der Proteine wurden pro Gel 500 µg hochreine Mitochondrien verwendet. Diese wurden pelletiert (12.000 x g, 10 min, 4 °C) und anschließend in 100 µl 2D-Lysepuffer (2D-Puffer mit 2 % (v/v) Pharmalyte pH 3-10 und 20 mM DTT) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (13.000 x g, 10 min, 4 °C), der Überstand mit 400 µl 2D-IPG-Puffer (2D-Puffer mit 2 % (v/v) Pharmalyte pH 3-10 und 0,002 % (w/v) Bromphenolblau

und ggf. 1,25 % (v/v) De-Streak Reagenz) versetzt und die Probe auf den IPG-Streifen appliziert (2.4.14.2).

Für die 2D-DIGE wurden die Proben vor dem Gellauf mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Das Lösen der Farbstoffe („*CyDye DIGE Fluor minimal labeling kit*“, GE Healthcare) erfolgte in wasserfreiem DMF nach den Angaben des Herstellers, so dass jeder Farbstoff in einer Konzentration von 400 pmol/µl vorlag. Für jede Probe wurden 50 µg hochreine Mitochondrien verwendet. Diese wurden zunächst pelletiert (12.000 x g, 10 min, 4 °C), in 10 µl DIGE-Lysepuffer (2D-Puffer mit 30 mM Tris; pH 8,5) aufgenommen und mit 1 µl des entsprechenden Farbstoffes versetzt. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 µl L-Lysin (10 mM) abgestoppt und die Proben für 10 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend konnten alle parallel zu separierenden Proben eines Geles gemischt und mit 214 µl 2D-Puffer (ohne Tris) versetzt werden. Zur Visualisierung der Spots im Gel mittels Coomassie wurde mit nicht-markierten Proteinlysaten „aufgefüllt“, so dass eine Proteingesamtmenge von insgesamt 500 µg nicht überschritten wurde. Schließlich wurden 250 µl DIGE-IPG-Puffer (2D-Puffer mit 4 % (v/v) Pharmalyte pH 3-10, 10 mM DTT und 0,004 % (w/v) Bromphenolblau) zugegeben und diese Proben für die IEF verwendet.

2D-Puffer:	7 M	Harnstoff
	2 M	Thioharnstoff
	4 % (w/v)	CHAPS
		in ultrapurem H ₂ O (HPLC grade)

2.4.14.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden IPG-Streifen eines weiten pH-Bereiches von 3-11 gewählt, welcher sich nicht-linear über die Länge eines 24 cm-Streifens erstreckt (*Immobiline Dry-Strips 3-11 NL*, GE Healthcare). Nicht linear bedeutet in diesem Falle, dass die „extremen“ Randbereiche (pH ~3-5 und pH~9-11) klein gehalten werden. Der mittlere Bereich hingegen wird gestreckt, da sich der pI der meisten Proteine hier befindet.

Die Applikation der Proben (Gesamtvolumen 500 µl) erfolgte in der Regel mittels *in-gel* Rehydrierung. Alternativ wurden die Streifen nur mit IPG-Puffer üN rehydriert und die Probe dann mittels „*Cup loading*“ am sauren Ende des Streifens appliziert. Für die *in-gel* Rehydrierung wurde die Probe gleichmäßig in eine Vertiefung des *Reswelling Tray* pipettiert, der Streifen mit der Acrylamidseite nach unten hineingelegt und anschließend mit *Cover fluid* (GE Healthcare) überschichtet. Nach dem Einguellen der Probe üN (14-16 h) wurde die IEF im Ettan IPGphorII (GE Healthcare) gestartet. Diese fand in drei Schritten (1 h konstant bei 200 V, 2 h Gradient auf 1.000 V und 6 h konstant bei 8.000 V) statt, wobei die Stromstärke auf 50 µA pro Streifen begrenzt wurde.

2.4.14.3 Zweite Dimension (SDS-PAGE)

Nach erfolgter IEF wurde sofort die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension in Form einer SDS-PAGE angeschlossen. Es wurden 12 %ige SDS-Gele (vgl. 2.4.9) verwendet, welche im EttanDALTsix-Gel Caster mindestens 6 h vor der Assemblierung der zweiten Dimension gegossen wurden. Die Gelstreifen der ersten Dimension wurden nach der IEF zunächst für 15 min in SDS-Puffer mit DTT (10 mg/ml Puffer) und für weitere 15 min in SDS-Puffer mit Iodoacetamid (25 mg/ml Puffer) inkubiert. Anschließend wurden die Streifen horizontal auf die SDS-Gele aufgebracht und mit 0,5 % Agarose (in Elektrodenpuffer, mit 0,002 % Bromphenolblau) überschichtet. Die Elektrophorese wurde in der EttanDALTsix- Apparatur (1 h bei 0,5 W pro Gel, anschließend üN bei 1,5 W pro Gel) durchgeführt. Nach Beendigung des Gellaufes konnten DIGE-Gele direkt im Fluoreszenzscanner dokumentiert werden. In Gelen mit nicht-fluoreszenzmarkierten Proben wurden die Proteinspots durch verschiedene Färbemethoden (siehe 2.4.15) visualisiert.

SDS-Puffer:	75 mM	Tris/HCl (pH 8,8)
	6 M	Harnstoff
	29,3 % (v/v)	Glycerin
	2 % (w/v)	SDS
	0,002 % (w/v)	Bromphenolblau
		in ultrapurem H ₂ O (HPLC grade)

2.4.14.4 Dokumentation und Quantifizierung von DIGE-Gelen

DIGE-Gele wurden im Fluoreszenzscanner „Typhoon Trio“ (GE Healthcare) unter Verwendung der geeigneten Anregungs-/ Emissions-Wellenlängen für Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm) und Cy5 (633/670 nm) dokumentiert. Die Spannung des Lasers (PMT) wurde so angepasst, dass das maximale Volumen der Spots zwischen 70.000 und 90.000 lag. Die Auflösung betrug für den Vorscan 500 µm und für den finalen Scan 100 µm.

Die Auswertung, Spotdetektion sowie Quantifizierung der Gele erfolgte mit der Delta2D 4.0 Software (Decodon). Diese Software korrigiert zunächst Laufunterschiede zwischen den Gelen anhand von Vektoren („Warping“). Anschließend wird ein Fusionsbild aller auszuwertenden Gelbilder erzeugt, auf welchem die Spots detektiert wurden und die Spotumrisse schließlich auf jedes Gelbild transferiert werden können. Für die Auswertung wurden folgende Parameter verwendet: (i) *Warp-Strategie*: „All-to-one“ (Mastergel=WT); (ii) *Fusionstyp*: Union; (iii) *Spotdetektionsparameter*: *Local background region*: 98, *average spot size*: 32, *sensitivity in %*: 20. Zur Berechnung des Quotienten von Spot-Intensitäten wurde das mittlere Volumen der Spots (*mean normalized volume*) verwendet. Die in der Arbeit

angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz von Spotunterschieden wurde mit dem *Students t-Test* ($p < 0.05$) evaluiert.

2.4.15 Färbung von Proteingelen

2.4.15.1 *Pro-Q® Diamond* Phosphoproteinfärbung

Die spezifische Anfärbung von Phosphoproteinen in 2D-Gelen erfolgte mit dem „*Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain*“ (Invitrogen) nach einem optimierten Protokoll von Agrawal und Thelen [93]. Die Dokumentation der Gele erfolgte im „Typhoon Trio“-Fluoreszenzscanner (Anregungswellenlänge 532 nm, Emissionsfilter 560nmLP).

2.4.15.2 *Deep Purple™* Gesamtproteinfärbung

Eine sehr sensitive Fluoreszenzfärbung von Proteinen im Gel konnte mit dem „*Deep Purple™ Total Protein Stain*“ (GE Healthcare) erreicht werden. Die Färbung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und im „Typhoon Trio“-Fluoreszenzscanner dokumentiert (Anregungswellenlänge 532 nm, Emissionsfilter 610nmBP).

2.4.15.3 Gesamtproteinfärbung mit Coomassie® Brilliantblau

2.4.15.3.1 Klassische Färbung

Für die Standard-Färbung wurde das SDS-Gel für 15-20 min in der Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Das Gel wurde anschließend unter Schütteln entfärbt, wobei die Entfärbelösung mehrmalig gewechselt wurde.

Färbelösung:	42 % (v/v)	Methanol
	17 % (v/v)	Essigsäure
	0,1 % (w/v)	Coomassie® Brilliantblau G250
Entfärbelösung:	30 % (v/v)	Methanol
	7 % (v/v)	Essigsäure

2.4.15.3.2 Colloidale Coomassiefärbung (nach Neuhoﬀ)

Überwiegend wurde zur colorimetrischen Visualisierung von Gesamtproteinen im Gel die sehr sensitive, colloidale Coomassiefärbung nach Neuhoﬀ *et al.* [94] verwendet. Dafür wurde das Gel zunächst für 30 min fixiert und anschließend in der Färbelösung für mind. 2 h (bis zu 7 Tage) geschüttelt. Wurde das Gel getrocknet (Vakuum-Geltrockner, GE Healthcare), erfolgte vorher eine Inkubation für 30 min in 5 % (v/v) Glycerin.

Fixierer:	10 % (v/v)	Essigsäure
	40 % (v/v)	Ethanol
Färbelösung:	10 % (w/v)	Ammoniumsulfat
	1,2 % (v/v)	Phosphorsäure 85 % (w/w)
	10 ml	5 % Coomassie® Brillantblau G250 stock

2.4.16 *in gel* Aktivitätsnachweise

An eine native Trennung der Enzymkomplexe mittels BN- bzw. CN-PAGE konnte eine Aktivitätsfärbung angeschlossen werden. Vorteilhaft bei der Separation mittels CN-PAGE ist dabei die geringe Hintergrundfärbung des Geles.

2.4.16.1 *in gel* PDH-Assay

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll zum Nachweis einer PDH-Aktivität im Gel wurde modifiziert nach einer Färbemethode in fixierten Zellen [95]. Prinzip der Färbung ist die Bildung von Formazan aus NBT durch den Elektronentransfer von NADH, welches ein Produkt der Enzymreaktion des PDH-Komplexes ist.

Das native Gel wurde zunächst für 1 h in PDH-Assaypuffer äquilibriert. Anschließend wurde das Gel mit frischem Puffer, welcher 3 mM Pyruvat, 0,3 mM TPP, 3 mM NAD⁺, 0,75 mM NBT, 0,05 mM PMS und 0,75 mg/ml CoA enthält, überschichtet und für 30-60 min (bis ün) bei 30 °C inkubiert.

PDH-Assaypuffer:	50 mM	Tris/HCl (pH 7,4)
	1 mM	MgCl ₂
	0,1 mM	CaCl ₂
	0,05 mM	EDTA
		in ultrapurem H ₂ O (HPLC <i>grade</i>)

2.4.16.2 *in gel* ATPase-Assay

Der Nachweis der ATPase-Aktivität im Gel wurde nach dem Protokoll von Wittig *et al.* [91] durchgeführt, bei welchem die enzymatische Hydrolyse von ATP colorimetrisch durch die Präzipitation von Bleiphosphat verfolgt werden kann.

Das Gel wurde dazu für 2 h in ATPase-Assaypuffer äquilibriert. Anschließend wurde das Gel mit frischem Puffer überschichtet, welchem 8 mM ATP und 0,2 % (w/v) Bleinitrat zugesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln bei 30 °C.

ATPase-Assaypuffer:	270 mM	Glycin/Tris-Puffer (pH 8,4)
	14 mM	MgCl ₂
		in ultrapurem H ₂ O (HPLC grade)

2.4.17 Photometrische Enzymaktivitätsmessungen

Enzymkinetiken mitochondrialer Enzyme konnten durch Absorptionsmessungen photometrisch verfolgt werden. Hierbei wurde das Absorptionsmaximum (bei 340 nm) der Reaktionsprodukte NADH bzw. NADPH genutzt. Die Messung der Absorptionszunahme aufgrund der enzymatischen Aktivität erfolgte in 96-well Platten im Infinite™M200 (TECAN). Als Proben wurden stets enzymatisch präparierte und gereinigte Mitochondrien der entsprechenden Hefestämme verwendet. Als Nullwerte (*Blank*) wurden Proben gemessen, welche aus dem kompletten Reaktionsansatz bestehen, denen aber kein Startreagenz zugefügt wurde.

2.4.17.1 Messung von Dehydrogenase-Aktivitäten (PDH, KGDH, IDH)

Die Quantifizierung der Aktivität des PDH-Komplexes wurde im Wesentlichen nach dem Protokoll von James *et al.* [44] durchgeführt und ebenfalls in modifizierter Form zur Messung der Aktivitäten der KGDH und IDH genutzt.

Für die Messung verschiedener Dehydrogenase-Aktivitäten wurden pro well zunächst 40 µg Mitochondrien pelletiert (12.000 x g, 10 min, 4 °C), mit jeweils 200 µl Dehydrogenase-Assaypuffer versetzt und zur Lyse 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Pipettieren der Proben in die entsprechenden wells wurde die Reaktion durch Zugabe des entsprechenden Substrates gestartet. Dazu wurden pro well jeweils 3 mM Pyruvat (PDH), α-Ketoglutarat (KGDH) oder Isocitrat (IDH) zugegeben. Die kontinuierliche Absorptionsmessung ($A_{340\text{nm}}$) bei Inkubation bei 30 °C wurde sofort begonnen. Anhand einer NADH-Eichgerade konnte die gemessene Absorption in eine NADH-Konzentration umgerechnet werden. Die Steigung der Kurven in der linearen Phase wurde zur Berechnung der Aktivitäten verwendet und mit den jeweils parallel gemessenen Wildtyp-Aktivitäten ins Verhältnis gesetzt.

Dehydrogenase-Assaypuffer:	50 mM	KPP _i - Puffer (pH 7,4)
	1 mM	MgCl ₂
	2,6 mM	Cystein
	2,5 mM	NAD ⁺
	2 mM	TPP
	0,25 % (v/v)	Triton X-100
	0,13 mM	CoA

2.4.17.2 Aconitase-Aktivitätsmessung

Die Messung der Aconitase-Aktivität erfolgte im Wesentlichen nach dem Protokoll von Drapier und Hibbs [96], allerdings ohne die Zugabe einer IDH.

Für jedes *well* wurden 20 µg Mitochondrien pelletiert, 5 min in 200 µl Aconitase-Assaypuffer auf Eis inkubiert, in ein *well* transferiert und die Reaktion schließlich durch Zugabe von 0,2 mM NADP⁺ gestartet. Die Absorptionzunahme bei 340 nm (bei 30 °C) wurde zur Berechnung der Aktivität verwendet. Um auszuschließen, dass variierende Aconitase-Aktivitäten auf Veränderungen der zellulären IDH zurückzuführen sind („indirekter Assay“), wurde die Aktivität letzterer parallel bestimmt. Die in der Arbeit angegebenen Aconitase-Aktivitäten ergeben sich aus einem Quotient von Aconitase- und IDH-Aktivität.

Aconitase-Assaypuffer:	50 mM	Tris/HCl (pH 7,4)
	30 mM	Na-Citrat
	0,6 mM	MgCl ₂
	0,25 % (v/v)	Triton X-100

2.4.18 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) wurde genutzt um 2D-separierte Proteine zu identifizieren sowie ggf. Modifikationsstellen zu bestimmen. Alle Analysen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Bernard Hoflack am BIOTEC (TU Dresden) von Dr. Cornelia Czupalla durchgeführt.

Das Vorgehen bei der Aufarbeitung der aus dem Gel ausgeschnittenen Proteinspots ist detailliert in der Publikation von Czupalla *et al.* [97] beschrieben. Dies umfasst die *in-gel* Reduktion und S-Alkylierung der Proben, den Verdau mit Trypsin bzw. Chymotrypsin und die Peptidextraktion. Daran schloss sich die Analyse durch MALDI-MS oder nanoLC-MS/MS an.

2.4.18.1 MALDI-MS

Die *Matrix-assisted laser desorption/ionisation* (MALDI) - Analysen dienten der Identifikation von Proteinen und wurden im „Ultraflex MALDI-TOF/TOF“ Massenspektrometer (Bruker Daltonics) durchgeführt. Zur Prozessierung der Spektren sowie Generierung der Peaklisten wurde die flexAnalysis Software (version 2.2) genutzt. Die Proteinidentifikation wurde unter Verwendung von MASCOT (Matrix Sciences Ltd.) sowie der SwissProt-Datenbank [98] durchgeführt. Dabei wurden folgende Suchkriterien genutzt: (i) Taxonomie: *S. cerevisiae*; (ii) Enzymspezifität: Trypsin; (iii) Massengenauigkeit: 50 ppm (*peptide mass fingerprinting*) und 0.8 Da (Fragment-Ionen-Analyse); (iv) maximal eine fehlende Schnittstelle; (v) feste und variable Modifikationen: Cys-Carbamidomethylierung bzw. Met-Oxidation und ggf. Ser/Thr/Tyr- Phosphorylierung; (vi) Datenbank: SwissProt.

2.4.18.2 nanoLC-MS/MS

Nano-liquid chromatographie (LC) – MS/MS Analysen wurden zur Identifikation gering konzentrierter Proteinproben bzw. zur Sequenzierung von Peptiden und ggf. der Bestimmung von Modifizierungsstellen verwendet.

Für die Analysen wurden die extrahierten Peptide im „Tempo nanoMDLC-System“ (Applied Biosystems) bzw. „UltiMate3000 nanoHPLC system“ (Dionex) separiert und im „LTQ Orbitrap XL“ Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) analysiert. Die Spektren wurden in einem datenabhängigen Modus aufgenommen und MS/MS-Spektren der acht intensivsten Vorläufer-Ionen wurden in der Orbitrap aufgezeichnet. Die Prozessierung der Rohdaten erfolgte mit der „ProteomeDiscoverer“ Software unter Verwendung des Sequest Algorithmus und folgender Suchkriterien: (i) Taxonomie: *S. cerevisiae*; (ii) Enzymspezifität: Trypsin bzw. Chymotrypsin; (iii) Massengenauigkeit: 10 ppm (Vorläufer-Ionen-Analyse) und 0,8 Da (Fragment-Ionen-Analyse); (iv) maximal eine fehlende Schnittstelle; (v) feste und variable Modifikationen: Cys-Carbamidomethylierung bzw. Met-Oxidation, Arg- und Glu-Deamidierung und Lys-Lipoylierung; (vi) Datenbank: SwissProt. Proteine wurden als identifiziert betrachtet, wenn mindestens drei Peptide zugeordnet werden konnten.

2.4.18.3 Bestimmung der Phosphorylierungsstelle von Pda1p

Die putativen Pda1p-Phosphospots wurden aus dem 2D-Gel extrahiert und mittels nanoLC-MS/MS analysiert. Bei der Identifikation der Phosphorylierungsstelle von Pda1p (Abschnitt 3.2.4.3) kam eine *multiple reaction monitoring-initiated detection and sequencing scan* (MIDAS) - Methode für 156 MRMTM-Transitionen zur Anwendung. Zur Bestätigung der Phosphorylierungsstelle wurde die Neutralverlustmethode (H₃PO₄) für geeignete Fragmentationen angewendet. Das detaillierte Vorgehen kann der entsprechenden Publikation [99] entnommen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Proteomanalyse ausgewählter Deletionsstämme putativer mitochondrialer Kinasen und Phosphatasen

3.1.1 Bioinformatische Analysen zur Auswahl potentieller Kandidaten

Trotz der wachsenden Anzahl identifizierter mt Phosphoproteine in *S. cerevisiae* ist die Zahl bekannter Protein-Kinasen (PKasen) und -Phosphatasen (PPasen) in diesem Kompartiment gering. Zur Identifikation putativer mt PKasen bzw. PPasen mit Funktion in der mt Proteinphosphorylierung wurden zunächst bioinformatische Analysen durchgeführt.

Dafür wurden alle offenen Leserahmen (ORFs), welche in der SGD (*Saccharomyces genome database* [100], Stand 03/2007) gelistet sind, mittels der „GOterm“-Funktion nach folgenden Parametern gefiltert: (i) das Vorhandensein einer Kinase- oder Phosphatase-Domäne und (ii) eine bekannte mt oder eine unbekannte intrazelluläre Lokalisation. Aus diesen Analysen ergaben sich insgesamt 37 Kandidaten (29 PKasen und acht PPasen), zu deren weiteren Bewertung und Fokussierung der Arbeit ein Ranking vorgenommen wurde. Dabei wurden diejenigen Kandidaten hoch bewertet, die zusätzlich über (i) eine experimentell gezeigte katalytische Aktivität sowie (ii) eine bereits verifizierte mt Lokalisierung und/oder eine hohe Wahrscheinlichkeit (MITOPROT-Wert) für den Import in die Mitochondrien verfügen. Auf dieser Grundlage wurden zehn Kandidaten ausgewählt, für die initiale Proteomanalysen durchgeführt werden sollten. Die Ergebnisse der bioinformatischen Untersuchungen für diese Proteine sind in Tab. 1 dargestellt. Die Daten für alle weiteren putativen Kandidaten sind im Anhang (Tab. A1) aufgeführt.

Tab. 1 Ausgewählte PKasen bzw. PPasen mit potentieller mt Funktion.

Die bioinformatischen Analysen des Proteoms von *S. cerevisiae* wurden mit der „GOterm“-Funktion in der SGD (Stand 03/2007, www.yeastgenome.org, [100]) gefiltert, wobei als Kriterien (i) die Existenz einer Kinase - oder Phosphatasedomäne sowie (ii) eine mt oder unbekannte Lokalisation genutzt wurden. Die Kinase-bzw. Phosphatase-Aktivität sowie Vorhersagen/experimentelle Belege für eine mt Lokalisation der zehn ausgewählten Kandidaten sind angegeben.

	Name (systematisch)	Standard- name, Synonym	Klassifizierung*	Akti- vität <i>in vitro</i>	mt Lokalisation <i>in silico</i> **	<i>in vivo</i> ***
Kinasen						
# 1	Yil042cp	Pkp1p	atypische His-PKase	[25]	98 %	[101,102]
# 2	Ygl059wp	Pkp2p [†]	atypische PKase; PDK-Familie	[25]	75 %	[102]
# 3	Ycr008wp	Sat4p, Hal4p	Ser/Thr-PKase; NPR-like Familie	[25]	96 %	--
# 4	Ycr091wp	Kin82p	Ser/Thr-PKase; SGK-like Familie	[25]	97 %	--

	Name (systematisch)	Standard- name, Synonym	Klassifizierung*	Akti- vität <i>in vitro</i>	mt Lokalisation <i>in silico</i> **	<i>in vivo</i> ***
Kinasen (Fortsetzung)						
# 5	Yol045wp	Psk2p	Ser/Thr-PKase; PIM- <i>like</i> Familie	[25]	3 %	[102,103]
# 6	Ygr052wp	Fmp48p	Ser/Thr/Tyr-PKase	[25]	90 %	[102,103]
Phosphatasen						
# 7	Yor090cp	Ptc5p, Ppp1p	Ser/Thr-PPase; PP2C-Familie	[104]	99 %	[102,103]
# 8	Ycr079wp	Ptc6p, Ppp2p [‡]	Ser/Thr-PPase; PP2C-Familie	[105]	85 %	--
# 9	Yhr076wp	Ptc7p	Ser/Thr-PPase; PP2C-Familie	[106]	94 %	[102,103,107]
# 10	Ydl230wp	Ptp1p	Tyr-PPase; PTP-Familie	[108]	1 %	[101-103]

* Die Klassifizierung der PKasen erfolgte nach Hunter und Plowman [20] und die der PPasen nach Sakumoto *et al.* [26].

** Durch MITOPROT [109] vorhergesagte Wahrscheinlichkeit einer potentiellen mt Lokalisation des Proteins.

*** Proteine wurden in massenspektrometrischen Analysen hochreiner Mitochondrien identifiziert.

‡ Die Synonyme wurden in der vorliegenden Arbeit definiert.

Unter den gewählten Kandidaten fanden sich sechs PKasen verschiedener Klassen. Der Kinase Yil042cp, welche als His-Kinase klassifiziert wurde, konnte in eigenen Vorarbeiten [63] eine putative Rolle bei der Regulation des mt PDH-Komplexes zugeordnet werden. Ygl059wp weist ebenfalls Ähnlichkeit zu den prokaryotischen His-Kinasen auf und zählt zur Gruppe der atypischen Kinasen. Bei allen weiteren PKase-Kandidaten handelt es sich um putative Ser/Thr-PKasen, deren Funktionen bzw. Targetproteine weitestgehend unbekannt sind. Für die Kinase Ycr008wp wird eine Beteiligung bei der Salztoleranz postuliert [110], und Yol045wp wird eine Rolle bei der Regulation des Zucker-Metabolismus sowie der Translation zugeordnet [111]. Für Ygr052wp wurde bisher keine putative Funktion beschrieben. Interessanterweise weist deren katalytische Domäne sowohl die Signatur einer Ser/Thr-Kinase als auch einer Tyr-Kinase auf.

Des Weiteren wurden vier Phosphatasen ausgewählt, von denen drei Ser/Thr-PPasen der PP2C-Familie angehören und eine der PTP-Familie (Tyr-PPase) zugeordnet wird. Für Yor090cp konnte bereits eine Beteiligung an der Regulation des PDH-Komplexes postuliert werden [63]. Yhr076wp spielt möglicherweise eine Rolle bei der Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen unter Sauerstofflimitation [112] und Ydl230wp wird als negativer Regulator der Filamentation diskutiert [113]. Die genaue Funktionsweise bzw. physiologische Bedeutung der Phosphatasen ist bisher allerdings nicht bekannt.

Für diese zehn putativen mt PKasen bzw. PPasen wurde ein revers-genetischer Ansatz gewählt, um auf putative Targetproteine bzw. Funktionen im Mitochondrium Rückschlüsse ziehen zu können. Dafür wurde das mt Proteom der entsprechenden Kinase- bzw. Phosphatase-Deletionsmutanten („*loss-of-function*“) mittels 2D-Gelelektrophorese separiert und mit dem des Wildtyps (WT) verglichen. Zunächst wurde dazu die Methode der 2D-IEF/SDS-PAGE zur Separation des mt Proteoms von *S. cerevisiae* etabliert und optimiert.

3.1.2 Optimierung der 2D-Gelelektrophorese zur Analyse mt Proteome

Die 2D-IEF/SDS-PAGE zählt zu den am besten geeigneten Methoden zur Separation vergleichsweise komplexer Proteome. Die Trennung aufgrund zwei verschiedener Eigenschaften der Proteine (pI und Molekulargewicht) ermöglicht dabei auch eine Separation verschiedener Protein-Isoformen, die sich beispielsweise aufgrund einer posttranslationalen Modifikation unterscheiden.

Für die Optimierung der 2D-PAGE wurden Wildtyp-Mitochondrien mit der enzymatischen Präparation isoliert. Um eine Kontamination mit Proteinen anderer Kompartimenten zu minimieren, schloss sich stets eine Reinigung mittels zweimaliger Gradientenzentrifugation sowie NaCl-Behandlung an (siehe 2.4.1.3). Für die Kultivierung wurde in Vorversuchen Medium mit verschiedenen fermentierbaren (Glukose, Galaktose) bzw. nicht-fermentierbaren (Glycerin, Laktat, Ethanol) C-Quellen verwendet und die zweidimensionalen Proteinmuster hinsichtlich Spotanzahl und Separationsqualität verglichen. Das 2D-Gel nach Kultivierung in Vollmedium mit Ethanol (YPE) wies dabei die meisten distinkten Spots auf (Daten nicht gezeigt), so dass dieses Medium für alle folgenden Versuche gewählt wurde.

Anschließend wurde das Protokoll der 2D-IEF/SDS-PAGE hinsichtlich folgender Parameter optimiert: (i) Verwendung des *Destreak*-Reagenzes (GE Healthcare) zur Verbesserung der Separation insbesondere im basischen Bereich; (ii) Einfluss eines vorgeschalteten Fällungsschrittes der Proteine (Methanol-Chloroform-Fällung) bei der Probenvorbereitung; und (iii) Eignung verschiedener Applikationsmethoden der Lysate auf die IPG-Streifen in der ersten Dimension (*in-gel* Rehydrierung oder „*Cup-loading*“). Für einen Vergleich der Protokolle wurden mt Proteine des WT verwendet und parallel in vier verschiedenen Gelen separiert (siehe 2.4.14). Die Gelbilder nach Coomassiefärbung sind in Abb. 5 dargestellt.

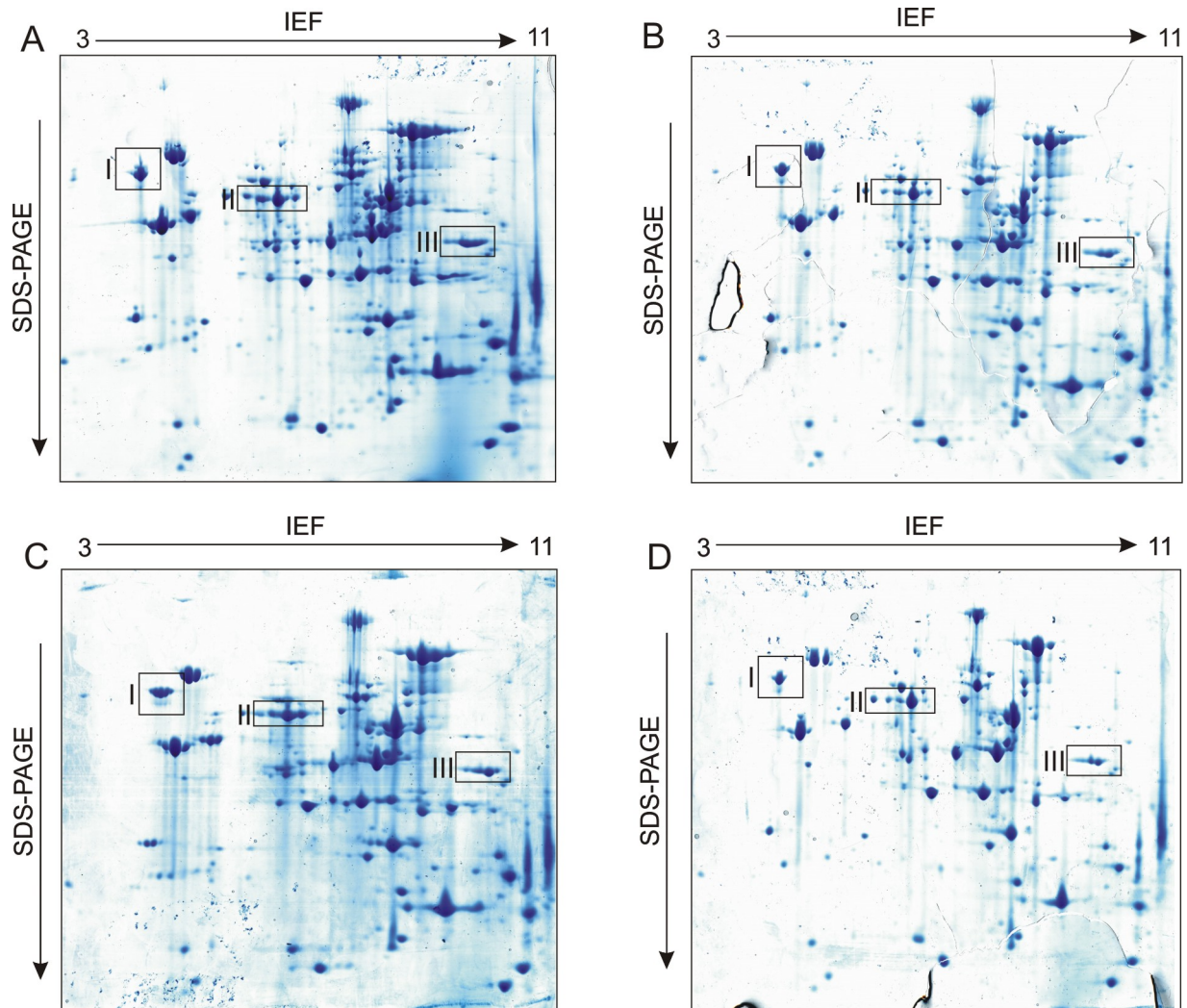


Abb. 5 Optimierung der 2D-IEF/SDS-PAGE zur Separation des mt Proteoms.

Der Wildtyp-Stamm (BY4741) wurde in YPE kultiviert und Mitochondrien wurden enzymatisch präpariert sowie mittels Gradientenzentrifugation und NaCl-Behandlung gereinigt. Für jedes Gel wurden 500 µg mt Protein verwendet. Die Separation erfolgte wie in Abschnitt 2.4.14 beschrieben in einem *Immobiline Dry-strip pH 3-11NL* in der ersten Dimension und einer 12 %igen SDS-PAGE in der zweiten Dimension. Dabei wurde die Vorgehensweise für jedes Gel etwas variiert: In (A) wurde der IPG-Puffer mit *Destreak*-Reagenz verwendet. Für (B) wurde die Probe nach der Lyse mittels einer Methanol-Chloroform-Fällung präzipitiert und das Pellet ebenfalls in IPG-Puffer mit *Destreak* gelöst. Für die Separation der Probe in (C) wurde IPG-Puffer ohne *Destreak*-Reagenz verwendet. Bei allen drei Gelen (A-C) erfolgte die Applikation der Proben durch *in-gel* Rehydrierung. Die Probe in (D) wurde nach der Lyse mittels „*Cup loading*“ auf den Streifen appliziert. Nach erfolgter 2D-Separation wurden die Gele mit Coomassie gefärbt. Die markierten Bereiche I-III sind im Text erklärt.

In den Gelbildern zeigt sich, dass mit jedem Protokoll eine gute Separation des mt Proteoms erreicht werden konnte. Die Intensität der Coomassiefärbung erscheint in den Gelen B und D etwas schwächer. Möglicherweise ging durch den Prozess der Fällung (B) bzw. das „*Cup loading*“ (D) ein Teil der Proteinmenge verloren. Zur Evaluation der Auftrennung wurde das Spotmuster in verschiedenen Bereichen des Gels verglichen (Abb. 5; I-III). Im mittleren pI-Bereich (pI~5-6; Bereich II) erscheint die Spotauftrennung in allen Gelen (A-D) vergleichbar zu sein. Überraschenderweise konnte die Zugabe des „*Destreak*“-Reagenzes bei den verwendeten Proben (A+B) die Auftrennung im basischen Bereich (pI~9-10; Bereich III) nicht verbessern. Vielmehr scheinen die Spots in der Probe ohne Verwendung dieses Reagenzes

(Abb. 5C, III) deutlicher getrennt zu sein. Detaillierter konnten in Gel C im Vergleich zu allen anderen Gelen auch die Spots im sauren Bereich (pI~5; Bereich I) aufgetrennt werden. Während im Bereich I in Gel A, B und D nur ein größerer Spot apparent ist, findet man diesen in Gel C in drei nebeneinander liegenden Spots.

Für alle weiteren Versuche wurde aufgrund dieser Ergebnisse das in (C) verwendete Protokoll gewählt (kein *Destreak*-Reagenz; Applikation mittels *in gel*-Rehydrierung).

3.1.3 2D-DIGE Analyse der zehn ausgewählten Kinase- bzw. Phosphatase-Deletionsstämme

Für die vergleichende quantitative Proteomanalyse der Deletionsstämme der putativen PKasen bzw. PPasen wurde die 2D-DIGE verwendet, bei welcher die Proben vor der 2D-Separation mit Cy-Farbstoffen markiert werden. Die DIGE-Methode zeichnet sich insbesondere durch seine Sensitivität und genaue Spotquantifizierung aus. Schwankungen aufgrund technischer Fehler werden durch die Verwendung des internen Standards (markiert mit Cy2; siehe 2.4.14) minimiert. Nach der Detektion im Fluoreszenzscanner können die Proteine im Gel mit Coomassie angefärbt, ausgeschnitten und durch MS identifiziert werden. Die detaillierte Durchführung der 2D-DIGE ist unter 2.4.14 beschrieben.

Die Analysen wurden mittels zweier unabhängiger DIGE-Experimente durchgeführt, um bei der Auswertung methodisch begründete Unterschiede weitestgehend ausschließen zu können. Die Proben für die Replikate stammten aus unabhängigen Mitochondrienpräparationen. Die Stämme wurden auf YPE kultiviert, Mitochondrien mittels der enzymatischen Methode präpariert und durch Gradientenzentrifugation und NaCl-Behandlung gereinigt (siehe 2.4.1.2 bzw. 2.4.1.3). Um Farbstoff-spezifische Unterschiede auszuschließen, wurde außerdem ein sogenannter „Dye-Swap“ durchgeführt, d.h. die im ersten Experiment mit Cy3 markierten Proben wurden im Wiederholungsexperiment mit Cy5 markiert und *vice versa* (Setup vgl. Tab. A2 im Anhang). Aus den Experimenten ergaben sich 34 Gelbilder (2x WT, 2x zehn Deletionsstämme, sowie 12x interner Standard), welche dem digitalen Anhang (Ordner „2D DIGE“) entnommen werden können. Die Auswertung aller Gelbilder und Quantifizierung der Spots erfolgte mit der Delta2D-Software (siehe 2.4.14.4). Diese Software generiert zunächst ein virtuelles Fusionsbild aller zu analysierender Gelbilder, auf welchem die Spotdetektion stattfindet (Abb. 6A). Die automatisch detektierten Spots wurden manuell unter Verwendung der 3D-Ansicht verifiziert. Schließlich wurden 436 distinkte Spots auf alle Gelbilder transferiert und das Verhältnis (mittleres Spotvolumen) zum entsprechenden WT-Spot quantifiziert. Interessante Spots wurden auf eine signifikante ($p < 0,05$) mindestens 2-fache Veränderung in einem Deletionsstamm im Verhältnis zum WT gefiltert. Diese Parameter erfüllten 22 Spots, von denen 15 mittels Coomassiefärbung im Gel visualisiert werden konnten. Final wurden die Proteine in 12 Spots durch MALDI-TOF/TOF

identifiziert (Abb. 6B und Tab. 2). Die Intensität der entsprechenden Spots im Vergleich zum WT ist in Tab. 2 durch eine entsprechende Farbgebung verdeutlicht. Signifikant veränderte Werte sind fett gedruckt. Die für die Farbgebung gewählten Grenzen entsprechen den in den WT-Replikaten vorkommenden Intensitätsschwankungen von etwa 25 % (gelb, 0,8-1,25), dem gewählten Schwellenwert einer 2-fachen Veränderung (Verhältnis 0,5 (grün) bzw. 2 (orange)) sowie Mischfarben für dazwischen liegende Bereiche.

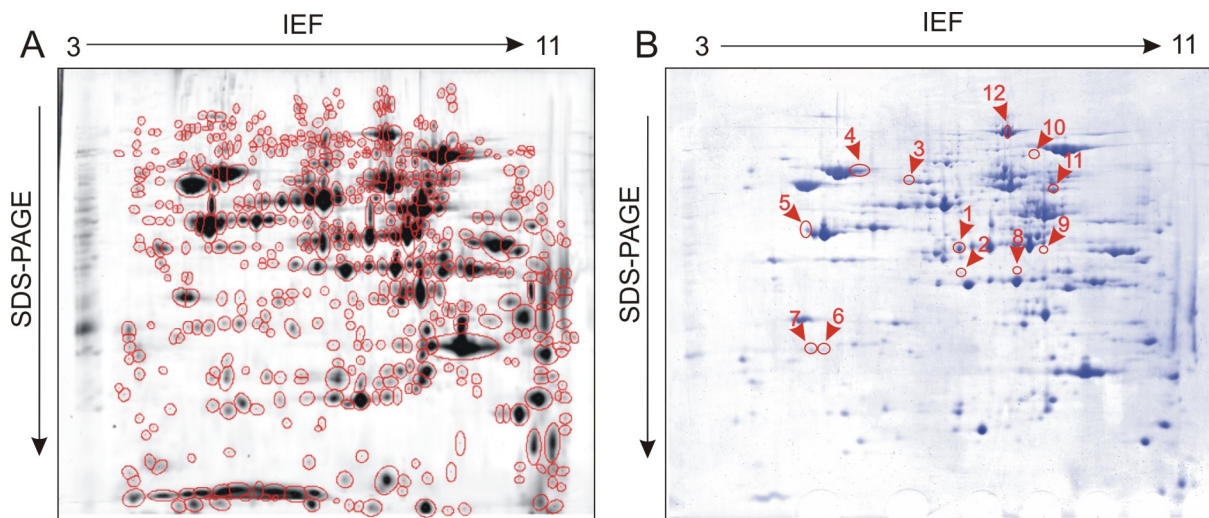


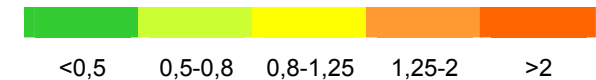
Abb. 6 Auswertung der vergleichenden DIGE-Analyse des WT und der zehn PKase- bzw. PPase- Deletionsstämme.

Hochreine Mitochondrien des WT sowie der zehn Deletionsstämme wurden in zwei unabhängigen DIGE-Experimenten analysiert (Setup vgl. Tab. A2). Für jedes Gel wurden 3x50 µg Mitochondrien mit je einem Cy-Farbstoff gelabelt und zusätzlich 3x100 µg nicht-markiertes mt Protein separiert. Die Separation erfolgte wie in Abschnitt 2.4.14 beschrieben in einem *Immobiline Dry-strip pH 3-11NL* in der ersten Dimension und einer 12 %igen SDS-PAGE in der zweiten Dimension. Die Gele wurden mit der Software Delta2D ausgewertet. Das virtuell generierte Fusionsbild sowie die detektierten Spots sind in (A) dargestellt. Nach der Coomassiefärbung wurden alle Spots ausgeschnitten, deren Intensität sich in mindestens einem Deletionsstamm im Vergleich zum WT signifikant ($p < 0,05$) 2-fach oder mehr veränderte (B). Die mittels MALDI-TOF/TOF identifizierten Proteine sind in Tab. 2 aufgelistet.

Unter den identifizierten Proteinen (Tab. 2) finden sich insbesondere Proteine, welche in der Aminosäure-Biosynthese (Leu4p, Ilv3p und Ilv5p), bei der oxidativen Stressabwehr (Yhb1p und Ccp1p) oder als Untereinheiten metabolischer Enzymkomplexe eine Rolle spielen. Hierbei wurden Untereinheiten der ATPase (Atp1p und Atp2p), der KGDH (Kgd1p) sowie des PDH-Komplexes (Pda1p und Lpd1p) analysiert. Des Weiteren wurde Ssc1p identifiziert, welches als essentielles Chaperon des TIM23-Komplexes am Transport mt Precursorproteine beteiligt ist. Potentiell stellen die meisten der Proteine auch Targets einer Phosphorylierung dar, da mit Ausnahme von Leu4p, Lpd1p und Ilv3p für alle Proteine Phosphopeptide identifiziert wurden (SwissProt Datenbank, Stand 05/2012).

Tab. 2 Proteine veränderter Abundanz in den Kinase-/Phosphatase- Deletionsstämmen.

Mt Proteine des WT sowie der zehn ausgewählten Kinase- bzw. Phosphatase-Deletionsstämmen wurden mittels 2D-DIGE analysiert (vgl. Abb. 6). Proteinspots, welche in mindestens einer Mutante signifikant verändert (Schwellenwert 2; $p < 0,05$) und nach einer Coomassiefärbung des 2D-Geles sichtbar waren, wurden durch MALDI-TOF/TOF identifiziert (Mascot Score, zugeordnete Peptide sowie Sequenzabdeckung sind angegeben). Aufgeführt sind der Name des Genes, die SwissProt-Nr. sowie das theoretische Molekulargewicht (M in Da) des identifizierten Proteins. Das „Verhältnis Spotintensität Δ -Mutante/WT“ bezeichnet den Quotienten der Intensitäten (normiertes mittleres Volumen) zwischen Deletionsmutante und WT. Die entsprechende Veränderung ist durch eine Farbgebung entsprechend des Schemas verdeutlicht. Signifikant veränderte Werte ($p < 0,05$) sind fett gedruckt.



Spot	Gen	Swiss Prot Nr.	Protein	M (Da)	Mascot Score (PMF)	zugeordnete Peptide	Sequenzabdeckung	Verhältnis Spotintensität Δ -Mutante/WT									
								Kinase-Deletionen					Phosphatase-Deletionen				
								$\Delta yil042c$ ($\Delta pkp1$)	$\Delta ygl059w$ ($\Delta pkp2$)	$\Delta ycr008w$ ($\Delta sat4$)	$\Delta ycr091w$ ($\Delta kin82$)	$\Delta yol045w$ ($\Delta psk2$)	$\Delta ygr052w$ ($\Delta fmp48$)	$\Delta yor090c$ ($\Delta ppp1$)	$\Delta ycr079w$ ($\Delta ppp2$)	$\Delta yhr076w$ ($\Delta ptc7$)	$\Delta ydl230w$ ($\Delta ptp1$)
1	PDA1	P16387	PDH-Komplex E1 α -Untereinheit	46712	361	35/52	70 %	0,45	0,45	1,08	1,11	1,12	1,16	1,47	1,90	1,03	1,17
2	YHB1	P39676	Flavohemoglobin	44846	54	4/7	11%	1,06	1,74	0,83	0,91	0,69	0,99	0,79	2,40	0,93	0,78
3	LEU4	P06208	2-Isopropylmalat-Synthase	68880	337	31/45	43%	1,07	0,53	0,71	0,45	0,38	0,46	0,51	0,42	0,53	0,41
4	SSC1	P12398	Hitzeschockprotein SSC1	70585	219	22/39	34%	0,49	0,44	0,52	0,44	0,53	0,49	0,53	0,43	0,51	0,54
5	ATP2	P00830	ATPase-Untereinheit β	54817	187	20/50	44%	1,88	2,09	2,26	1,52	2,31	1,04	2,44	1,80	1,35	1,24
6	CCP1	P00431	Cytochrom c – Peroxidase	40385	74	6/13	18%	0,71	0,65	0,62	0,97	0,52	0,84	0,46	0,55	0,94	0,41
7	CCP1	P00431	Cytochrom c – Peroxidase	40385	197	15/26	38%	0,62	0,56	0,48	0,90	0,51	0,77	0,35	0,37	0,79	0,36
8	ILV5	P06168	Ketolsäure-Reduktoisomerase	44512	323	28/46	68%	19,99	6,7	8,64	12,02	7,63	14,14	8,11	8,31	11,87	7,68
9	ILV5	P06168	Ketolsäure-Reduktoisomerase	44512	250	19/36	46%	28,15	90,94	16,58	13,34	34,00	19,40	25,7	30,41	44,14	69,94
10	LPD1	P09624	PDH-Komplex E3-Untereinheit	54261	300	30/66	70%	5,22	6,61	6,57	8,40	7,06	3,77	9,41	5,95	8,13	6,72
	ATP1	P07251	ATPase-Untereinheit α	58629	129	17/66	36%										
11	ILV3	P39522	Dihydroxysäure-Dehydratase	63391	146	17/58	31%	0,77	0,32	0,28	0,52	0,40	0,42	0,36	0,45	0,49	0,37
12	KGD1	P20967	KGDH-Komplex E1-Untereinheit	114744	267	34/59	33%	0,57	0,52	0,59	0,68	0,60	0,63	0,61	0,47	0,66	0,60

Bei der Auswertung der Daten fiel auf, dass viele der ermittelten Werte nicht signifikant waren. Dies ist vermutlich auf die lediglich in Duplikaten durchgeführten Analysen zurückzuführen, wodurch statistische Tests wie der *Student's* t-Test zwar anwendbar sind, die gewählte Signifikanzgrenze ($p < 0,05$) aber relativ stringent gesetzt ist. Des Weiteren bestand bei einem Großteil der Spots in nahezu allen Proben eine ähnliche Tendenz der Zu- oder Abnahme der Spotintensität (Spot 3-12, in Tab. 2 durch die Farbgebung verdeutlicht). Es ist somit schwierig, auf den spezifischen Effekt bzw. das Target einer PKase oder PPase Rückschlüsse zu ziehen. Erklärungen könnten sekundäre Effekte sein, die beispielsweise durch die für die Deletionen verwendete Kanamycin-Resistenzkassette entstehen könnten. Diese codiert für eine Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase, welche Kanamycin bzw. G418 phosphoryliert und damit inaktiviert [114]. Denkbar wäre, dass die artifizielle Expression dieses Proteins sekundär auch Auswirkungen auf das mt Proteom haben könnte. Ebenso wäre es möglich, dass einige der identifizierten Proteine - insbesondere jene, die in der Stressantwort eine Rolle spielen - häufig bei einer Beeinträchtigung der Zelle beeinflusst werden.

Spezifische Veränderungen konnten lediglich für Spot 1 sowie für das in Spot 2 identifizierte Yhb1p festgestellt werden. Bei beiden Spots wurden in den meisten Stämmen ähnliche Spotintensitäten oder nur geringe Schwankungen im Vergleich zum WT festgestellt. Das Flavohämoglobin (Yhb1p; Abb. 6, Spot 2) weist einzig in dem Stamm $\Delta ycr079w$ eine etwa 2,5-fache Intensität auf. Yhb1p ist eine Stickoxid-Oxidoreduktase, welche eine Rolle bei der oxidativen und nitrosativen Stressantwort spielt. Der Proteinspot von höherer Intensität bei der PPase-Deletion $\Delta ycr079w$ könnte möglicherweise eine phosphorylierte Form von Yhb1p darstellen. Denkbar wäre jedoch auch – insbesondere durch die Rolle von Yhb1p in der Stressantwort – ein sekundärer Effekt des Fehlens von Ycr079wp.

Als interessantester Proteinspot der Analysen stellte sich Spot 1 heraus, für den signifikante Intensitätsänderungen in mehreren Stämmen detektiert wurden. Der Spot ist dabei in den PKase-Deletionen $\Delta yil042c$ und $\Delta ygl059w$ etwas mehr als 2-fach geringer abundant, wohingegen die Intensität in den PPase-Deletionen $\Delta yor090c$ 1,5-fach und in $\Delta ycr079w$ etwa 2-fach erhöht ist (Tab. 2). In allen anderen Stämmen weicht der Wert hingegen nur gering von dem des WT ab, was auf die Spezifität der beobachteten Veränderungen hindeutet. Mittels MALDI-TOF/TOF konnte dieser Spot als Pda1p, die E1 α -Untereinheit des PDH-Komplexes, identifiziert werden und stellt damit ein putatives Target dieser PKasen bzw. PPasen dar. Eine Phosphorylierung von Pda1p wurde in *S. cerevisiae* bereits von James *et al.* (1995, [44]) nachgewiesen. Des Weiteren konnten dem Protein in den letzten Jahren in verschiedenen massenspektrometrischen Studien mehrere Phosphopeptide zugeordnet werden [55-58,115-117].

Welchen konkreten Einfluss die Deletionen auf Pda1p haben, kann aus den DIGE-Analysen jedoch nicht abgeleitet werden. Die Charakterisierung der zwei Kinasen (Yil042cp und Ygl059wp) und zwei Phosphatasen (Yor090cp und Ycr079wp) sowie deren molekulare Wirkung auf Pda1p bzw. den PDH-Komplex wurden im Weiteren in den Fokus der Untersuchungen gestellt.

3.2 Funktionelle Analysen zur Regulation des PDH-Komplexes

Yil042cp wurde erstmals von Wünschmann (2004; [79]) als putative PDH-Kinase benannt und Untersuchungen in eigenen Vorarbeiten [78] lieferten Belege für eine Interaktion mit Pda1p. Die Kinase wurde aufgrund der postulierten Beteiligung an der Regulation des PDH-Komplexes als Pkp1p (für Proteinkinase PDH) bezeichnet [63]. Ygl059wp weist über weite Bereiche Homologien zu Pkp1p (43 %) sowie den humanen PDH-Kinasen PDK 1-4 (38-47 %) auf. Ein Sequenzvergleich der Kinasen (durchgeführt mit ClustalW2 [118]) ist in Abb. A1 im Anhang dargestellt. Die Ergebnisse des DIGE-Experimentes (Abschnitt 3.1) lassen außerdem einen Einfluss auf Pda1p vermuten und stellen Ygl059wp als putative PDH-Kinase heraus, weshalb Ygl059wp im Weiteren als Pkp2p bezeichnet wird.

Für Yor090cp lieferten initiale Untersuchungen ebenfalls Hinweise auf eine mögliche Beteiligung an der Regulation des PDH-Komplexes [78]. Die Phosphatase wurde in der Folge als Ppp1p (für Proteinphosphatase PDH) bezeichnet [63]. Ycr079wp gehört wie Ppp1p zu den PPasen vom Typ 2C und besitzt eine hohe Homologie zu dieser Phosphatase (43 %) sowie zu den humanen Äquivalenten PDP1 und 2 (je 42 %; ClustalW2-Sequenzvergleich vgl. Abb. A2 im Anhang). Außerdem lieferten die Ergebnisse der 2D-DIGE Hinweise auf eine Beeinflussung von Pda1p bei Deletion von YCR079w. Aufgrund der putativen Rolle als PDH-Phosphatase wird Ycr079wp im Weiteren als Ppp2p bezeichnet.

In die folgenden initialen Studien wurde die Typ 2C-Phosphatase Yhr076wp einbezogen. Obgleich in den DIGE-Experimenten kein Einfluss auf den identifizierten Pda1p-Spot zu beobachten war (Abschnitt 3.1), ist diese Phosphatase ebenfalls ein potentieller Kandidat für eine PDH-Phosphatase. Yhr076wp ist homolog zu Ppp1p (37 %) sowie Ppp2p (30 %) und wurde bereits in den mehreren Studien im Mitochondrium lokalisiert [102,103,107].

3.2.1 Lokalisationsstudie von Pkp2p, Ppp2p und Yhr076wp

Mit Ausnahme von Ppp2p wurden die putativen PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen bereits durch massenspektrometrische Analysen in Mitochondrien identifiziert (vgl.

Tab. 1). Eine mt Lokalisierung stellt eine essentielle Voraussetzung für eine direkte Beteiligung an der Regulation des in der Matrix lokalisierten PDH-Komplexes [119] dar. Die intrazelluläre Lokalisierung sollte initial für Pkp2p, Ppp2p sowie Yhr076wp verifiziert werden. Dafür wurden Stämme verwendet, welche für C-terminal mit einem Epitop-tag versehene Varianten der Kinasen bzw. Phosphatasen codieren. Es wurden Mitochondrien der Stämme Pkp2-HA, Ppp2-HA und Yhr076w-cMyc enzymatisch präpariert und mittels Saccharose-Gradienten-Zentrifugation gereinigt. Außerdem wurde eine Hochsalzbehandlung angeschlossen, um an den Mitochondrien mittels ionischer Wechselwirkungen assoziierte Proteine abzulösen (siehe 2.4.1.3). Als Referenz wurden Pkp1p-cMyc und Ppp1p-HA mitgeführt, für welche bereits eine mt Lokalisation gezeigt wurde [63,78]. Die verschiedenen Fraktionen wurden im Anschluss in einer SDS-PAGE separiert und mittels Western Blot und Immundetektion analysiert (Abb. 7).

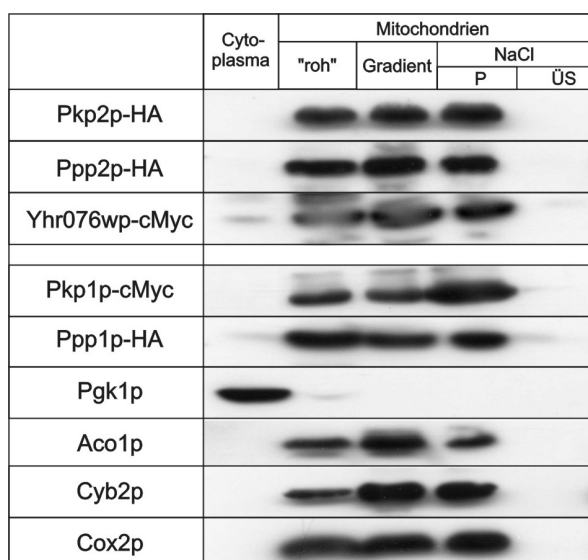


Abb. 7 Lokalisationsstudie der Kinasen Pkp1p und Pkp2p und der Phosphatasen Ppp1p, Ppp2p und Yhr076wp.

Von den Stämmen, welche die angegebenen getaggten Versionen der entsprechenden Proteine exprimieren, wurden Mitochondrien enzymatisch präpariert und gereinigt. Es wurden jeweils 50 µg der cytoplasmatischen (Spur 1) sowie mt Proteinfraction vor (Spur 2) bzw. die Fraktion nach der Saccharose-Gradientenzentrifugation (Spur 3) aufgetragen. 50 µg der gereinigten Mitochondrien wurden anschließend mit 1 M NaCl (unter osmotisch stabilisierten Bedingungen) inkubiert (Spur 4) und der Überstand (ÜS) nach dieser Behandlung mittels TCA-Fällung präzipitiert (Spur 5). Die Proben wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE separiert und nach Western Blot mit HA- bzw. cMyc- sowie den angegebenen Kontroll-Antikörpern analysiert.

Die cytoplasmatisch lokalisierte, eng mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziierte, Phosphoglyceratkinase (Pgk1p) lässt sich nur in der Cytoplasmafraktion (Abb. 7, Spur 1) und in geringer Konzentration in der Fraktion der ungereinigten Mitochondrien (Spur 2) nachweisen. Auch nach einer Überexposition des Filmes kann in den gereinigten mt Fraktionen (Abb. 7, Spur 3+4) kein Signal detektiert werden. Dies belegt die Präparation einer hochreiner Mitochondrienfraktionen, die frei von cytoplasmatischen Kontaminationen ist. Die mt Proteine Aco1p (mt Matrix), Cyb2p (mt

IMS) und Cox2p (IMM) zeigen in der cytoplasmatischen Fraktion (Spur 1) kein Signal, weisen aber in den Mitochondrienfraktionen (Spur 2 - 4) Signale vergleichbarer Intensität auf. Die getaggten Kinasen bzw. Phosphatasen wurden mittels HA- bzw. cMyc-Antikörpern nachgewiesen und weisen ein zu den mt Kontrollproteinen identisches Separationsprofil auf. Lediglich für Yhr076wp konnte ein schwaches Signal in der cytoplasmatischen Fraktion detektiert werden. Da auch nach Überexposition des Filmes für die löslichen mt Proteine Aco1p und Cyb2p kein Signal in dieser Fraktion detektiert werden konnte, ist dies nicht auf eine Kontamination mit mt Proteinen zurückzuführen (z.B. durch Verlust der Integrität einiger Mitochondrien während der Präparation). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei Yhr076wp um ein dual lokalisiertes Protein handelt, wobei der Hauptanteil in den Mitochondrien präsent ist. Die PKasen Pkp1p und Pkp2p sowie PPasen Ppp1p und Ppp2p konnten ausschließlich in den mt Fraktionen nachgewiesen werden. Auch nach der NaCl-Behandlung können die Proteine im Mitochondrienpellet detektiert werden (Spur 4) und liegen folglich nicht cytoplasmaseitig assoziiert mit der äußeren Membran vor. Es konnte damit verifiziert werden, dass es sich bei den putativen PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen um mt Proteine handelt.

Ergänzend wurde für Ppp2p die submitochondriale Lokalisierung durch Proteinase K-Behandlung von Mitochondrien bzw. Mitoplasten (siehe 2.4.2) detaillierter bestimmt, um Angaben zu einer Lokalisation im mt IMS [120] experimentell zu überprüfen. Dafür wurden Mitochondrien enzymatisch präpariert und Mitoplasten durch eine hypoosmotische Behandlung generiert. Daran schloss sich die Inkubation mit Proteinase K an. Als Kontrolle wurden parallel Aliquots mitgeführt, welche ohne Zugabe der Proteinase K (Abb. 8, Spur 1 und 4) sowie mit dieser unter Anwesenheit von 1% Triton X-100 (Spur 3 und 6) inkubiert wurden.

	Mitochondrien			Mitoplasten		
Proteinase K	-	+	+	-	+	+
Triton X-100	-	-	+	-	-	+
Ppp2p-HA						
Aco1p						
Cyb2p						
Ccp1p						

Abb. 8 Proteinase K- Behandlung von Mitochondrien sowie Mitoplasten des Stammes Ppp2-HA.

Mitochondrien des Stammes Ppp2-HA wurden enzymatisch präpariert und Mitoplasten generiert. Die Behandlung von jeweils 50 µg Mitochondrien bzw. Mitoplasten erfolgte mit 0,5 µg/µl Proteinase K in An- bzw. Abwesenheit von 1 % (v/v) Triton X-100. Nach der Separation in einer 12 %igen SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine Membran transferiert und immunologisch mit HA- und den angegebenen Kontroll-Antikörpern für die mt Matrix (Aco1p) sowie das IMS (Cyb2p und Ccp1p) analysiert.

In den intakten Mitochondrien (Abb. 8, Spur 2) ist Ppp2p offensichtlich vor einem Abbau durch Proteinase K geschützt. Die Signalstärke von Ppp2p-HA in dieser Fraktion ist vergleichbar mit jener in der unbehandelten Probe (Abb. 8; Spur 1). Dies trifft auch für die detektierten Kontrollproteine der mt Matrix (Aco1p) sowie des IMS (Cyb2p und Ccp1p) zu. Das Fehlen von Signalen nach der Lyse der Mitochondrien bzw. Mitoplasten durch Triton X-100 (Spur 3 und 6) verdeutlicht, dass die Proteine *per se* nicht Proteinase K-resistent sind. In den Mitoplasten (Abb. 8, Spur 5) konnte nur Ppp2p sowie Aco1p nach der Proteinase K-Behandlung detektiert werden, wohingegen nur noch sehr schwache Signale der IMS-Proteine Cyb2p und Ccp1p sichtbar waren. Dieser Befund spricht gegen eine Lokalisierung von Ppp2p im IMS und legt nahe, dass es sich um ein Protein der mt Matrix handelt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der *in silico* - Vorhersage einer putativen Schnittstelle einer mt Präsequenz an AS-Position 34 [109].

3.2.2 Analyse der PDH-Aktivität in den Kinase- bzw. Phosphatase-Deletionsstämmen

Die PDH katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und stellt damit die Verbindung zwischen Glykolyse und Citratzyklus her. Die zentrale Rolle sowie Irreversibilität der PDH-Reaktion erfordert eine intensive Regulation an dieser Stelle im Metabolismus. Der PDH-Komplex von Säugern wird durch Phosphorylierung der Pda1p-Untereinheit durch spezifische Kinasen inaktiviert und kann durch das Abspalten der Phosphatreste durch PDH-Phosphatasen wieder vollständig reaktiviert werden [31]. Durch die Verwendung einer heterologen Kinase bzw. Phosphatase konnte zumindest *in vitro* ein ähnlicher Mechanismus für die Regulation der Enzymaktivität des PDH-Komplexes in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden [121].

Um auf die physiologische Rolle der putativen regulatorischen Enzyme Rückschlüsse ziehen zu können, sollte im Folgenden der Einfluss einer Deletion der putativen PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen auf die Aktivität des PDH-Komplexes untersucht werden. Dazu wurden Mitochondrien der entsprechenden Deletionsstämme isoliert und gereinigt. Die Aktivität des PDH-Komplexes wurde durch einen colorimetrischen Aktivitätsassay nach Separation in einer nativen Elektrophorese sowie mittels eines photometrischen Assays bestimmt.

3.2.2.1 *in-gel* PDH-Aktivitätsfärbung nach Separation mittels CN-PAGE

Aktivitätsfärbungen im Gel nach nativer Separation bieten den Vorteil der Analyse der Enzymaktivität im direkten Zusammenhang mit der molekularen Organisation des

entsprechenden Enzymkomplexes. Für eine solche Untersuchung im Bezug auf die PDH bestand die Herausforderung, diesen etwa 8-9 MDa großen Komplex [41] im Gel zu separieren und dabei auch schwache Proteinwechselwirkungen aufrecht zu erhalten. Dies gelang durch Modifikation der Separationsbedingungen („Niedrigsalz“, siehe 2.4.13) und die Verwendung niederprozentiger Gele in der nativen Gelelektrophorese. Ein colorimetrischer Assay konnte genutzt werden, um die Aktivität der PDH im Gel sichtbar zu machen und zwischen den verschiedenen Stämmen zu vergleichen. In diesem Assay wird die Bildung von NADH während der Enzymreaktion indirekt durch die Reduktion von Nitrotetrazoliumblau (NBT) zu violetter Formazan visualisiert. Die *clear-native* (CN)-PAGE eignet sich aufgrund des farblosen Hintergrundes besonders gut für derartige Farbreaktionen.

Es wurden jeweils 200 µg hochreine Mitochondrien des WT und der verschiedenen Deletionsstämmen in einer 3-13 %igen CN-PAGE (mit 2,5 %igem Sammelgel) separiert, anschließend die PDH-Aktivitätsfärbung (siehe 2.4.16.1) durchgeführt und die Farbentwicklung über die Zeit verfolgt (Abb. 9). Als Kontrolle schloss sich eine Färbung der ATPase-Aktivität im Gel (siehe 2.4.16.2) an, bei welcher davon ausgegangen werden kann, dass diese sehr wahrscheinlich nicht von der Deletion der PKasen bzw. PPasen beeinflusst wird.

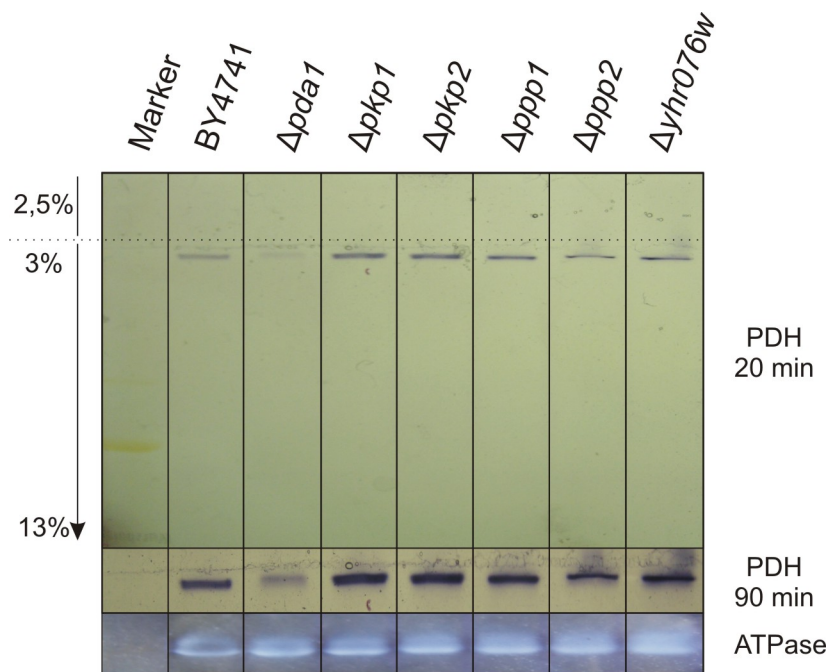


Abb. 9 „in gel“-Aktivitätsassay zum Nachweis der PDH-Aktivität im WT sowie den Deletionsstämmen der putativen PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen.

Je 200 µg hochreine Mitochondrien des WT (BY4741) sowie der angegebenen Deletionsstämmen und 5 µl des Nativmarkers wurden in einer 3-13 %igen CN-PAGE (mit 2,5 %igem Sammelgel) separiert. Anschließend wurde die PDH-Aktivitätsfärbung durchgeführt und nach 20 min sowie nach 90 min dokumentiert. Im Anschluss wurde als Referenzfärbung die ATPase-Aktivität im Gel visualisiert.

Durch die ATPase-Färbung (Abb. 9, unten) lässt sich abschätzen, dass in allen Spuren vergleichbare Proteinmengen der präparierten Mitochondrien separiert wurden. Im Zuge der PDH-Aktivitätsfärbung kann eine violette Bande direkt an der Grenze zwischen 2,5 und 3 %igem Gel detektiert werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um den voll-assemblierten, etwa 8 MDa großen, PDH-Komplex. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass zumindest nach kürzerer Inkubationszeit (Abb. 9, 20 min) in dem Deletionsstamm $\Delta pda1$ (Deletion der E1 α -Untereinheit der PDH, Spur 3) keine Färbung sichtbar war. Im weiteren zeitlichen Verlauf (Abb. 9, 90 min PDH) wurde allerdings auch hier eine schwache Färbung sichtbar. Diese ist vermutlich auf die Aktivität anderer mit Dehydrogenasen zurückzuführen, welche ebenfalls in einem hochmolekularen Komplex organisiert sind [122]. Vergleicht man die Intensität der Färbung in den verschiedenen PKase- bzw. PPase-Deletionsstämmen, dann erscheint diese in den Deletionen der Kinasen ($\Delta pkp1$ und $\Delta pkp2$) im Vergleich zum WT (Spur 2) etwas stärker. Dies könnte auf eine gesteigerte Aktivität des Komplexes hindeuten. Dementgegen kann insbesondere in dem Deletionsstamm $\Delta ppp2$ eine schwächere Färbung nachgewiesen werden, was eine verminderte PDH-Aktivität nahelegt. Die Intensität in den PPase-Deletionsstämmen $\Delta ppp1$ sowie $\Delta yhr076w$ scheint ähnlich der des WT zu sein.

Obgleich die Aktivitätsfärbung Hinweise auf eine beeinflusste PDH-Aktivität liefert, ist eine tatsächliche Quantifizierung anhand dieses colorimetrischen Assays schwierig. Zusätzlich erschwerend ist dabei, dass der Assay nicht hochspezifisch für die PDH zu sein scheint, da im Deletionsstamm $\Delta pda1$ zumindest nach längerer Inkubation auch eine schwache violette Bande sichtbar wurde. Die Aktivität wurde aus diesem Grund im Folgenden mittels eines photometrischen Assays basierend auf der Reduktion von NAD⁺ zu NADH quantifiziert.

3.2.2.2 Biochemische Analyse der PDH-Aktivität

Die biochemische Messung der PDH-Aktivität (siehe 2.4.17.1) in gereinigten Mitochondrien der entsprechenden Stämme erfolgte nach Zugabe der Substrate der PDH durch die Messung des Anstieges der Absorption bei 340 nm (Absorptionsmaximum NADH). Die sich ergebenden Kurven der verschiedenen Deletionsstämmen sind in Abb. 10A dargestellt. Anhand des Anstieges in der linearen Phase der Reaktion wurde die PDH-Aktivität berechnet und prozentual im Verhältnis zum WT angegeben (Abb. 10 B+C). Die Messungen wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt und insgesamt mit Mitochondrien von drei unterschiedlichen Präparationen wiederholt.

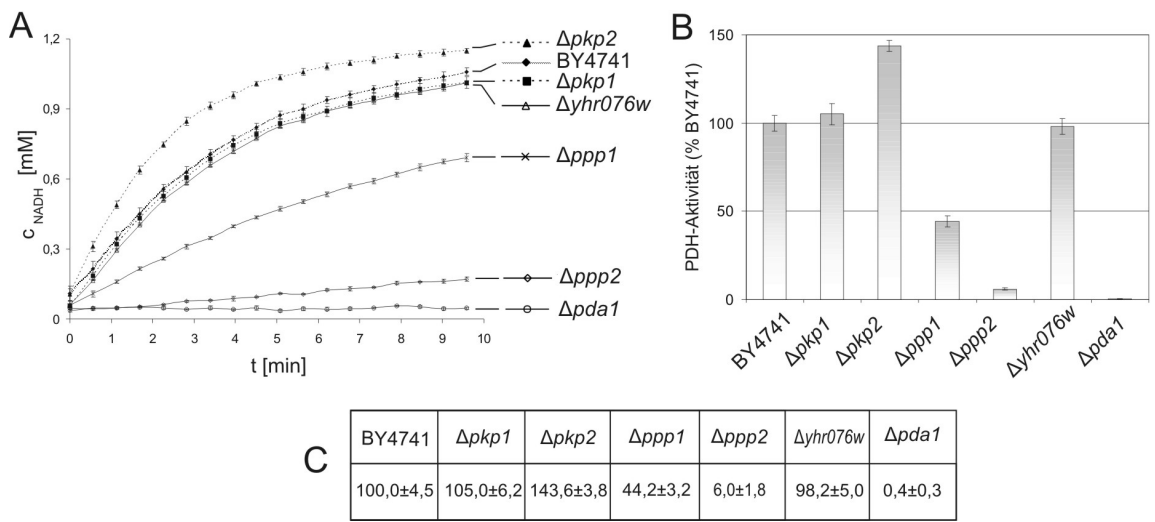


Abb. 10 Photometrischer PDH-Aktivitätsassay des WT sowie der Deletionsstämme der putativen PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen.

Die PDH-Aktivitätsmessung in hochreinen Mitochondrien des WT (BY4741) sowie der angegebenen Deletionsstämme wurde wie unter 2.4.17.1 beschrieben durchgeführt und die Zunahme der Konzentration des NADH (A_{340nm}) über die Zeit verfolgt (**A**). Die relativen Aktivitäten wurden durch die Berechnung des linearen Anstieges in den ersten 90 s bestimmt, wobei die Aktivität des WT 100 % gesetzt wurde (**B+C**). Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Triplikaten von drei unabhängigen Experimenten. Entsprechende Standardabweichungen sind durch Balken bzw. \pm gekennzeichnet.

Die Zunahme der Absorption bzw. NADH-Konzentration im WT (Abb. 10A) folgt einer typischen Enzymkinetik, wobei bis etwa zur dritten Minute ein linearer Anstieg zu verzeichnen ist. Im Anschluss flacht die Kurve ab und nähert sich einem Plateau an. Im Deletionsstamm $\Delta pda1$ ist kein Anstieg ersichtlich, was für eine hohe Spezifität dieses Assays spricht. Bei $\Delta pkp2$ ist ein stärkerer Anstieg im Vergleich zum WT zu verzeichnen, wohingegen die Kurven bei $\Delta ppp1$ und insbesondere $\Delta ppp2$ deutlich schwächer ansteigen und hier im gemessenen Zeitraum das Plateau nicht erreicht wird.

Durch Berechnung der Anstiege im linearen Bereich konnte die Aktivität im Vergleich zum WT quantifiziert werden (Diagramm in Abb. 10B, Werte unter 10C). Wie bereits beschrieben [63] führt eine Deletion von *PPP1* zu einer etwa um die Hälfte verringerten PDH-Aktivität, wohingegen die Aktivität durch das Fehlen der Kinase Pkp1p unter den gewählten Bedingungen nicht signifikant verändert wird. Eine Deletion von Pkp2p führt hingegen zu einer etwa 44 % höheren PDH-Aktivität. Im Umkehrschluss spricht dieser Befund dafür, dass diese Kinase *in vivo* eine inaktivierende Wirkung auf den PDH-Komplex besitzt. Im Deletionsstamm $\Delta ppp2$ kommt es hingegen zu einem starken Verlust an PDH-Aktivität. Nur eine geringe Restaktivität von 6 % konnte detektiert werden, was eine fehlende Aktivierung des PDH-Komplexes bei Deletion dieser Phosphatase nahelegt.

Im Deletionsstamm $\Delta yhr076w$ ist hingegen keine veränderte PDH-Aktivität zu verzeichnen. Dieser Befund spricht in Verbindung mit der Quantifizierung des Pda1p-Spots in der DIGE-Analyse (Abschnitt 3.1.3) gegen eine Beteiligung von Yhr076wp an der Regulation des PDH-Komplexes, weshalb diese Phosphatase im Folgenden nicht weiter analysiert wurde.

3.2.3 Phänotypische Analyse der Kinase- bzw. Phosphatase-Deletionsstämme

Durch einen Wachstumsassay sollte der Einfluss einer Deletion der regulatorischen PDH-Enzyme auf das Wachstum der Hefe auf verschiedenen C-Quellen (YPD und YPE) untersucht werden. Als Kontrollen wurden der WT (BY4741) sowie der Deletionsstamm $\Delta pda1$ mitgeführt. Die Analyse erfolgte durch die Trübungsmessung von Kulturen in 96-well Platten im Nephelometer (siehe 2.3.1.2). Die ermittelten Kurven des Anstieges der Lichtstreuung über die Zeit sind in Abb. 11 dargestellt.

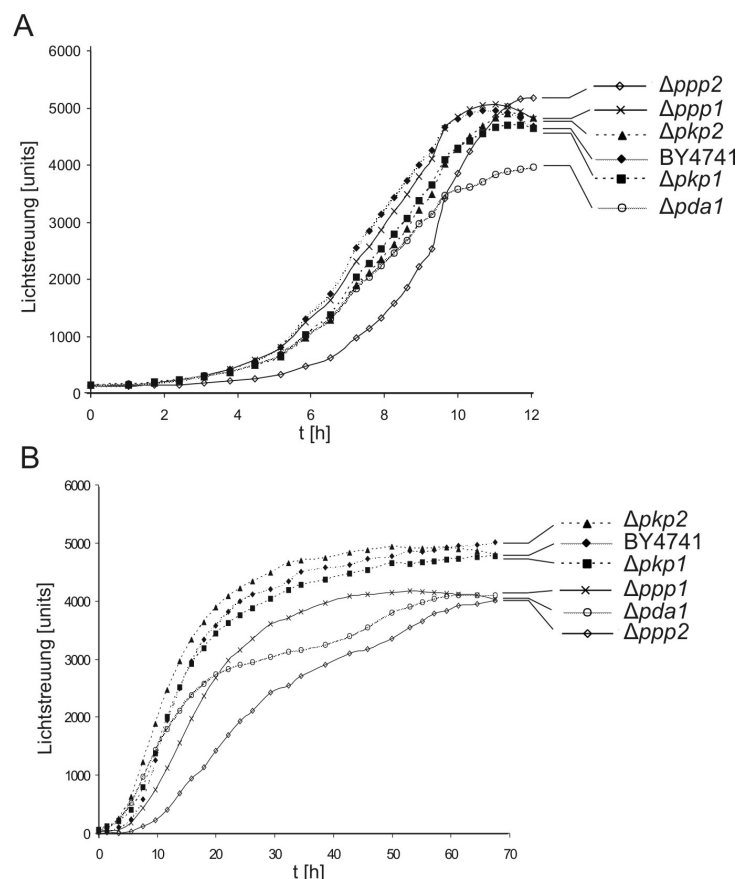


Abb. 11 Wachstumsanalyse des WT sowie der Deletionsstämme der PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen.

Die Wachstumskinetik der angegebenen Stämme auf Vollmedium mit Glukose (A) oder Ethanol (B) wurde durch die Trübungsmessung im Nephelometer über die Zeit verfolgt. Die Messung wurde während der Kultivierung bei 30 °C in 96 well-Platten mit 200 µl Medium und 10^4 Zellen pro well durchgeführt. Die angegebenen Kurven ergeben sich aus Mittelwerten von drei Replikaten.

Aus den Wachstumsanalysen war ersichtlich, dass auch ein Verlust der PDH-Aktivität im Stamm $\Delta pda1$ weder auf fermentierbaren (YPD, Abb. 11A) noch auf nicht-fermentierbaren C-Quellen (YPE, Abb. 11B) letal ist. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass *S. cerevisiae* über sogenannte PDH-Bypässe verfügt - Stoffwechselwege, durch die auf alternativem Weg Pyruvat zu Acetyl-CoA umgesetzt wird [123]. Das Fehlen einer aktiven PDH in $\Delta pda1$ führt allerdings zu einer verminderten Wachstumsrate sowie einer etwas geringeren Zelldichte in beiden Medien am Endpunkt der Messung. Dieser Befund bestätigt die Daten von Wenzel *et al.* (1992, [124]). Während die Deletionen der PDH-Kinasen ($\Delta pkp1$ und $\Delta pkp2$) offensichtlich keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum haben, führt das Fehlen von Ppp1p oder Ppp2p zu einem leicht verminderten Wachstum in YPE (Abb. 11B). Die Wachstumsrate scheint dabei in $\Delta ppp2$ deutlicher vermindert zu sein, was mit der stärkeren Beeinträchtigung der PDH-Aktivität (vgl. 3.2.2) erklärt werden könnte. Die Restaktivität der PDH in den Phosphatase-Deletionsstämmen ist aber offenbar ausreichend, um auf YPD eine dem WT ähnliche Zelldichte zu erreichen (Abb. 11A). Ein interessanter Befund ist auch die im Stamm $\Delta ppp2$ verlängerte *lag*-Phase in beiden Medien, was auf eine zusätzliche physiologische Funktion der Phosphatase neben der PDH-Regulation hindeuten könnte.

3.2.4 Analysen zur Identifizierung des Targets der Phosphorylierung

Die initialen DIGE-Analysen (siehe 3.1.3) lieferten Hinweise auf einen Einfluss der Deletionen der putativen regulatorischen PDH-Kinasen/-Phosphatasen auf die Abundanz eines Pda1p-Spots. Die Analysen lassen allerdings offen, ob es sich um einen direkten oder indirekten Einfluss handelt und welcher Art die Veränderung ist. Dies sollte im Folgenden anhand phosphospezifischer Proteomanalysen näher untersucht werden.

3.2.4.1 2D-Analyse mit Phosphoprotein-spezifischer Färbung

Für die Analysen wurden hochreine Mitochondrien des WT sowie der PKase- bzw. PPase-Deletionsstämmen präpariert und je 500 µg in einer 2D-IEF/SDS-PAGE separiert. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele zunächst mit einem phosphospezifischen Fluoreszenzfarbstoff (*Pro-Q[®] Diamond*) und im Anschluss mit einer fluoreszenten Gesamtproteinfärbung (*Deep Purple[™]*) gefärbt (siehe 2.4.15). Beispielhaft sind die Gelbilder des WT in Abb. 12A (Gesamtprotein) bzw. 12B (Phosphoprotein) dargestellt. Der relevante Gelbereich (in A und B durch Rechteck markiert) ist für alle Stämme in Abb. 12C dargestellt (komplette Gelbilder aller Stämme im digitalen Anhang, Ordner „2D PDA1“).

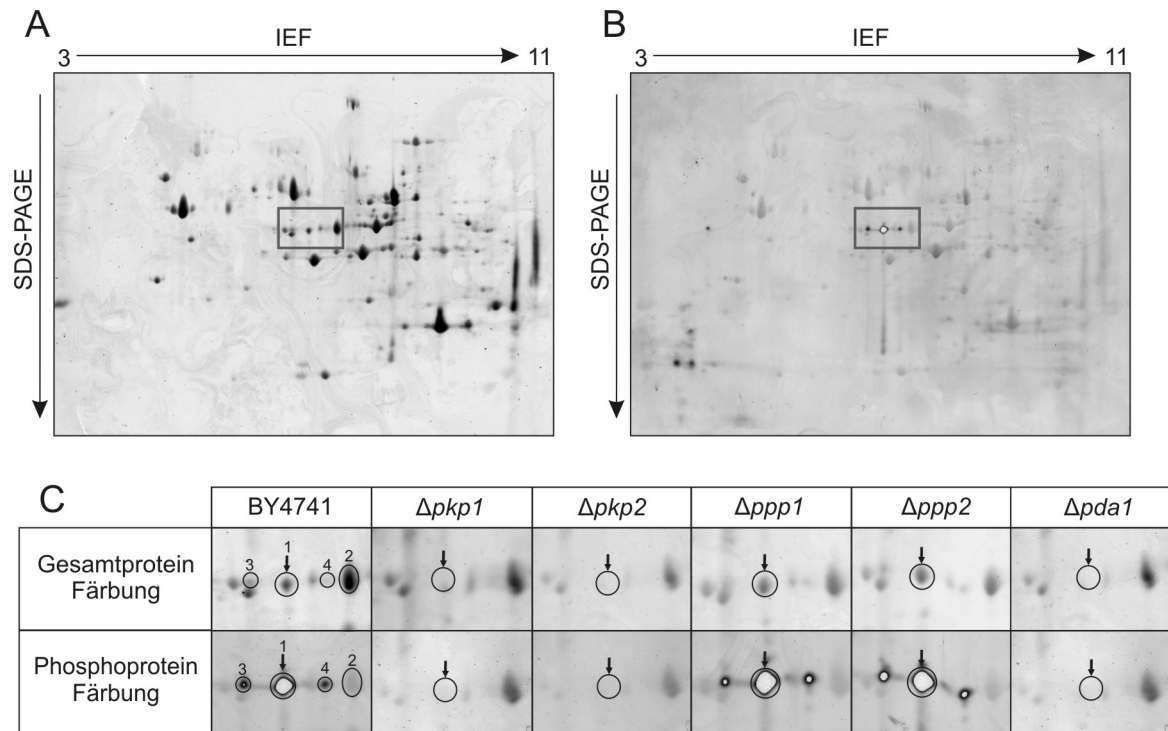


Abb. 12 2D-IEF/SDS-PAGE mt Proteine mit anschließender Phosphoprotein- und Gesamtprotein-Färbung.

Proteine hochreiner Mitochondrien der verschiedenen Stämme wurden in einer IEF von pH 3-11 gefolgt von einer 12 %igen SDS-PAGE separiert. Die Gele wurden im Anschluss mit dem „Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel stain“ sowie einer Gesamtproteinfärbung (Deep Purple™) gefärbt. Die Bilder des Wildtyp-Geles (BY4741) sind in (A) (Gesamtprotein) bzw. (B) (Phosphoprotein) dargestellt. Der durch den Rahmen gekennzeichnete Bereich ist in (C) für beide Färbungen aller Stämme dargestellt. Weiße Bereiche im Zentrum einiger Spots resultieren von Signalen im Sättigungsbereich. Nummerierte bzw. markierte Spots sind im Text erläutert.

Die Gesamtproteinfärbung des WT-Geles (Abb. 12A) veranschaulicht repräsentativ die Separation des mt Proteoms in den 2D-Gelen. In der Phosphoproteinfärbung (Abb. 12B) wurden insbesondere im zentralen Bereich starke Signale detektiert, welche sich bereits bei geringer Laseranregung in der Sättigung befanden (weißes Zentrum der Spots). Des Weiteren fiel auf, dass spezifische Signale außerhalb dieses Bereiches nur sehr schwierig auszumachen waren, da im Hintergrund nahezu alle Proteine mehr oder weniger stark angefärbt wurden. Dies ist vermutlich auf die bereits beschriebene Eigenschaft des Farbstoffes, auch abundante nicht-phosphorylierte Proteine im Gel anzufärben, zurückzuführen [71].

Der durch das Rechteck in Abb. 12A und B markierte Bereich ist in Abb. 12C für den WT, die Deletionsstämme der putativen PDH-Kinasen/-Phosphatasen sowie den $\Delta pda1$ -Stamm zur besseren Auswertbarkeit separat dargestellt. Bei der vergleichenden Analyse fiel auf, dass die Intensität von Spot 1 (in Abb. 12C durch Kreis markiert) deutlich zwischen den Gelen variierte. Die Position entspricht dem bereits in den DIGE-Analysen identifizierten Pda1p-Spot (Spot 1, siehe 3.1.3). Dieser Spot liefert im WT sowie $\Delta ppp1$ - und $\Delta ppp2$ -Stamm in der Phosphofärbung ein Signal oberhalb der Detektionsgrenze

(weißes Zentrum der Spots; Abb. 12C, untere Reihe). Obgleich die absolute Quantifizierung aufgrund der Signale in der Sättigung nicht möglich ist, erscheint der Spot in den Phosphatase-Deletionen im Vergleich zum WT etwas stärker abundant zu sein. Bei Fehlen von Pda1p selbst bzw. der Kinase Pkp1p oder Pkp2p kann kein Signal detektiert werden. Diese Phosphoproteinanalysen sind neben den PDH-Aktivitätsmessungen ein weiterer experimenteller Beleg, dass Pda1p ein Zielprotein beider Kinasen bzw. Phosphatasen ist.

Zusätzlich zu diesem starken Phosphosignal waren zwei kleinere Spots gleichem Molekulargewichts sichtbar (Abb. 12C; Spot 3 und 4), deren Intensität in der Phosphofärbung in den verschiedenen Stämmen sich ähnlich verhielt wie Spot 1. Aufgrund der geringen Abundanz dieser Spots gelang es jedoch nicht, die Proteine mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Möglicherweise repräsentieren diese Spots Pda1p-Varianten, welche sich in ihrem pI aufgrund unterschiedlicher Modifikationen oder Sekundärstrukturen unterscheiden. Diese Annahme wird durch einen Vergleich mit den 2D-Analysen mit Proteome von Ohlmeier *et al.* (2004, [107]) gestützt, in welchen an den analogen Positionen der Spots 1, 3 und 4 Pda1p identifiziert werden konnte. Es kann hier allerdings keine Aussage dazu getroffen werden, in welcher Art und Weise sich die verschiedenen, offensichtlich phosphorylierten Pda1p-Varianten unterscheiden.

Interessanterweise fehlt bei Abwesenheit von Pkp1p oder Pkp2p nicht nur der Pda1p-Spot in der Phosphoproteinfärbung, sondern – ähnlich wie im $\Delta pda1$ -Stamm – ebenso in der Gesamtproteinfärbung. Vermutlich führt die fehlende Ladung bei Verlust der Phosphatgruppe zu einer Veränderung des pI-Wertes des Proteins, wahrscheinlich in Richtung des basischen Bereiches. Trotz der Analyse einiger Spots in diesem Bereich konnte kein Spot eindeutig Pda1p zugeordnet werden. Vermutlich wird der Spot von dem sehr abundanten Cor1p-Spot ([107], Abb. 12C, Spot 2) überlagert. Mittels MALDI-TOF/TOF konnten tatsächlich neben Cor1p (Score 297, Sequenzabdeckung 70 %) auch Pda1p Peptide zugeordnet werden (Score 52, Sequenzabdeckung 20 %). Interessanterweise zeigt sich beim Vergleich der abgedeckten Sequenzbereiche von Pda1p in Spot 1 und 2 (MASCOT-Analyse ohne variable Modifikationen, vgl. Abb. A3 im Anhang), dass in Spot 2 trotz der geringeren Sequenzabdeckung das Peptid mit der putativen Phosphorylierungsstelle an Ser313 [57,58] gefunden wurde. Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass es sich bei Pda1p in diesem Spot um die nicht-phosphorylierte Variante handelt. In Spot 1 hingegen wird das Peptid in der MASCOT-Analyse nicht gefunden, was sehr wahrscheinlich auf die durch die Phosphatgruppe verursachte Massenänderung zurückzuführen ist. Ändert man die Parameter in der

MASCOT-Software und lässt als mögliche Modifikationen Ser/Thr-Phosphorylierungen zu, konnte ein Peptid entsprechender Masse gefunden werden.

Aufgrund der Überlagerung der Proteinspots sowie Signalen in der Sättigung erwies sich anhand dieser Gele eine quantitative Analyse der Pda1p-Spots als schwierig und wurde im Folgenden mittels detaillierter DIGE-Analysen durchgeführt.

3.2.4.2 Detaillierte quantitative Analyse von Pda1p

Zur genaueren Untersuchung der Pda1p-Spots wurde eine detaillierte Analyse der DIGE-Gele (siehe 3.1.3) durchgeführt. Die Quantifizierung des phosphorylierten Pda1p-Spots (Spot 1) sowie des Spots, welcher Cor1p+Pda1p repräsentiert (Spot 2), erfolgte in der Delta2D-Software (Abb. 13A). Um die Pda1p-Gesamtproteinmenge in der Zelle („*steady-state*“) unabhängig von der Präsenz in verschiedenen Isoformen zu untersuchen, sollte Pda1p nach der eindimensionalen Separation analysiert werden. Da für das Hefeprotein keine kommerziell erhältlichen Antikörper verfügbar sind, wurde *PDA1* im WT sowie den Stämmen $\Delta pkp1$, $\Delta pkp2$, $\Delta ppp1$ und $\Delta ppp2$ mit einem HA-Epitop-tag fusioniert. Die korrekte Integration der *Tagging*-Kassette in das Genom wurde mittels diagnostischer PCR bestätigt und die Expression des Fusionskonstruktes mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Nach der Separation mit Proteine dieser Stämme in einer SDS-PAGE erfolgte die immunologische Detektion mit HA- und Cox2p-Antikörpern (Abb. 13B).

In den Kinase-Deletionsstämmen $\Delta pkp1$ und $\Delta pkp2$ sinkt die Abundanz des Pda1p-Phosphospot (Abb. 9A) je auf etwa 45 % im Vergleich zum WT. Dementgegen steigt die Spotintensität bei Deletion einer der putativen PDH-Phosphatasen um etwa 50 % ($\Delta ppp1$) bzw. 90 % ($\Delta ppp2$) an. Interessanterweise ist die Intensität des Phospho-Pda1p Spots entgegengesetzt proportional zu der gemessenen PDH-Aktivität (siehe 3.2.2.2). Dies spricht erneut für die Rolle der Kinasen bei der Phosphorylierung sowie Inaktivierung von Pda1p und eine Dephosphorylierung sowie Reaktivierung durch Ppp1p bzw. Ppp2p. Für Spot 2, in welchem das nicht-phosphorylierte Pda1p vorliegt (vgl. 3.2.4.1), kann zumindest andeutungsweise ein inverser Effekt beobachtet werden (Abb. 13A). Während die Abundanz in den Kinasedeletionen leicht ansteigt, da ein größerer Anteil des Pda1p nicht-phosphoryliert vorliegt, ist sie im $\Delta ppp1$ - bzw. $\Delta ppp2$ -Stamm um etwa ein Viertel vermindert. Das Ausmaß der Änderung ist allerdings nicht so deutlich wie in Spot 1, da wie bereits erwähnt das abundante Cor1p in diesem Spot mit der Quantifizierung interferiert.

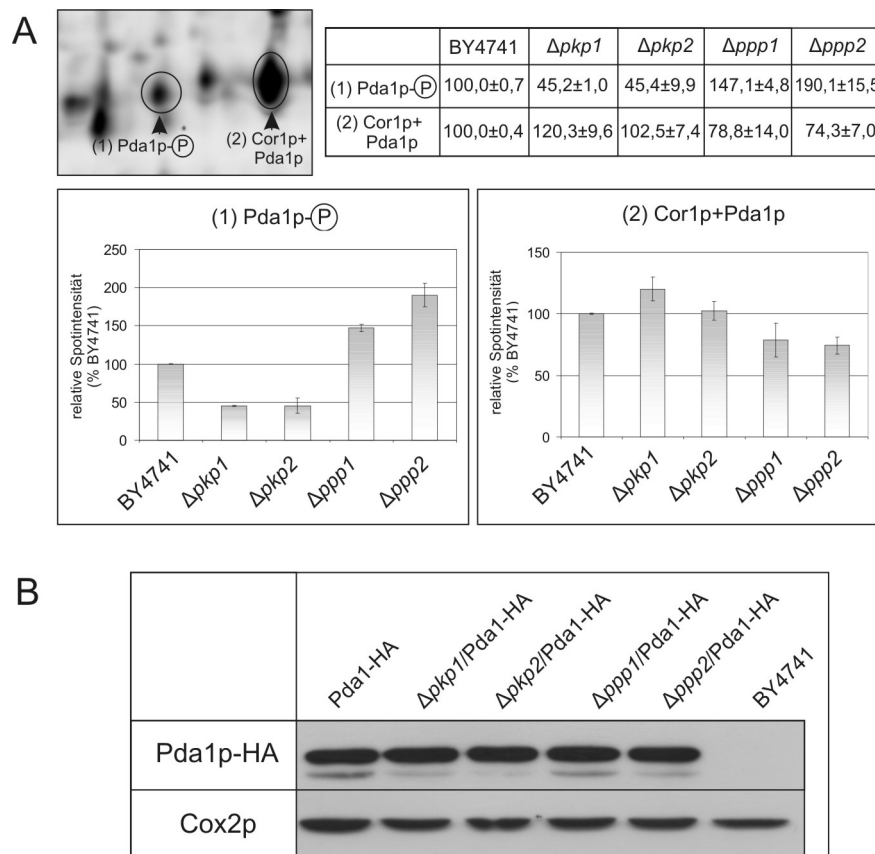


Abb. 13 Quantifizierung der Pda1p-Spots nach 2D-Separation (A) und Detektion der „steady-state“-Konzentration von Pda1p nach 1D-Separation (B).

(A) Mt Proteine des WT (BY4741), der Deletionsstämmen der putativen PDH-Kinasen ($\Delta pkp1$, $\Delta pkp2$) sowie PDH-Phosphatasen ($\Delta ppp1$, $\Delta ppp2$) wurden mittels 2D-DIGE analysiert. Der Gelbereich, in welchem sich die Pda1p-Spots befinden, ist exemplarisch für den WT dargestellt. Die Quantifizierung der Spots (mittleres normiertes Volumen, WT = 100 %) erfolgte mittels der Delta2D-Software und ist in der Tabelle angegeben sowie in den Balkendiagrammen dargestellt. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Duplikaten (Standardabweichung durch Balken bzw. \pm gekennzeichnet). (B) Mitochondrien der angegebenen Stämme wurden nach Kultivierung auf YPE mit der mechanischen Methode präpariert und jeweils 30 μ g Protein in einer 12 %igen SDS-PAGE separiert. Nach dem Transfer auf eine Membran erfolgte die Detektion mit HA-Antikörpern. Die immunologische Detektion von Cox2p diente als Ladekontrolle.

Bei der Analyse der „steady-state“-Konzentration in der eindimensionalen Elektrophorese (Abb. 13B) kann in allen Stämmen ein etwa gleichstarkes Signal bei etwa 49 kDa detektiert werden, was etwa dem erwarteten Molekulargewicht von Pda1p mit dem HA-tag entspricht. Die Deletionen der Kinasen bzw. Phosphatasen beeinflussen offensichtlich nicht die intrazelluläre Konzentration von Pda1p, sondern nur dessen Phosphorylierungszustand und damit Aktivität. Insbesondere in Spur 1 (Pda1-HA) sowie Spur 4+5 (Phosphatasedelektionen) kann zusätzlich eine schwache Bande unterhalb des Hauptsignals detektiert werden. Möglicherweise handelt es sich um die phosphorylierte Variante von Pda1p, welche auch in der 1D-Separation ein verändertes Migrationsverhalten aufweisen könnte. Denkbar wäre auch, dass es sich um ein proteolytisches Abbauprodukt handelt. Die stärkere Abundanz der Bande bei

Abwesenheit der Phosphatasen könnte ein Hinweis auf einen vermehrten Abbau von Pda1p aufgrund der Inaktivierung durch Phosphorylierung sein. Ob es sich allerdings tatsächlich um einen physiologisch begründeten Unterschied handelt oder dies auf die Präparation zurückzuführen ist, wurde nicht näher untersucht und bleibt spekulativ.

3.2.4.3 Analyse der Phosphorylierungsstelle durch Massenspektrometrie

Durch detaillierte MS-Analysen sollte die Phosphorylierungsstelle bzw. -stellen des Pda1p-Phosphospots (vgl. Abb. 12C bzw. 13A) und damit die Target-Aminosäure der PDH-Kinasen bzw.- Phosphatasen identifiziert werden. Pda1p-Spot 1 wurde aus dem Gel ausgeschnitten und extrahierte Proteine mittels Trypsin verdaut. Für die Analyse kam eine *multiple reaction monitoring-initiated detection and sequencing scan* (MIDAS) - Methode für 156 MRMTM-Transitionen, welche potentielle Ser-/Thr- oder Tyr-Phosphorylierungsstellen abdeckte, zur Anwendung. Geeignete Peptide wurden zusätzlich anhand der Neutralverlustmethode (H_3PO_4) analysiert. Abbildung 14 zeigt das Spektrum des phosphorylierten Peptides sowie die durch Fragmentationanalyse erhaltene Sequenz.

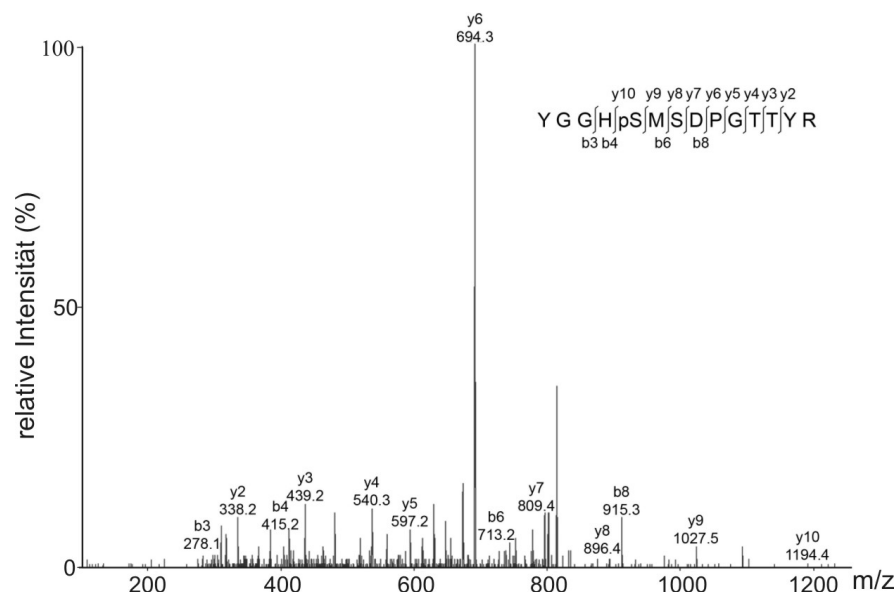


Abb. 14 Pda1p- MS/MS Spektrum von m/z 804,81²⁺ mit Fragmentzuordnung.

Der phosphorylierte Pda1p-Spot (Spot 1) wurde aus dem Gel extrahiert und mittels nanoLC-MS/MS analysiert. Die Sequenz des Pda1p-Peptides mit der identifizierten Phosphorylierungsstelle an Ser313 (pS) ist oberhalb des Spektrums angegeben.

Durch die MS-Analysen konnte ein monophosphoryliertes Peptid (Retentionszeit 5,78 min) identifiziert werden, dessen Fragmentationanalyse die Sequenz ³⁰⁹YGGHpSMSDPGTTIR³²² ergab (Abb. 10). Die Phosphorylierung an Ser313 konnte des Weiteren durch die Analyse der b6- sowie y10-Ionen bestätigt werden, welche den

Neutralverlust von H_3PO_4 zeigten (Daten nicht gezeigt). Die y8- und y9-Ionen wiesen diesen hingegen nicht auf, wodurch eine Phosphorylierung an Ser315 ausgeschlossen werden. Die Phosphorylierungsstelle von Pda1p und somit die Targetamino-säure der Kinasen Pkp1p und Pkp2p bzw. der Phosphatasen Ppp1p und Ppp2p kann damit eindeutig Ser313 zugeordnet werden.

3.2.5 Herstellung und Analyse der Doppeldeletionsstämme $\Delta pkp1+2$ und $\Delta ppp1+2$

In den vorangegangenen Proteom- bzw. Aktivitätsanalysen wurde unter Verwendung der entsprechenden Einzeldelentionsstämme gezeigt, dass die zwei Kinasen Pkp1p und Pkp2p sowie die zwei Phosphatasen Ppp1p und Ppp2p in die Regulation des Phosphorylierungszustandes von Pda1p und damit der PDH-Aktivität involviert sind. Um Aussagen hinsichtlich der Auswirkungen beim Verlust jeweils beider Kinasen bzw. Phosphatasen zu erhalten, wurden entsprechende Doppeldeletionsstämme generiert und untersucht.

3.2.5.1 Generierung der Doppeldeletionsstämme durch Kreuzung

Um Stämme zu erhalten, in denen entweder *PKP1* und *PKP2* oder *PPP1* und *PPP2* deletiert sind, wurden die Ausgangsstämme $\Delta pkp1$ (*Mating* α) und $\Delta pkp2$ (*Mating* a) sowie $\Delta ppp1$ (*Mating* α) und $\Delta ppp2$ (*Mating* a) gekreuzt. Die resultierenden Diploiden wurden im Anschluss sporuliert und die Tetraden vereinzelt (siehe 2.2.1). Da die Deletionen in allen Einzelmutanten durch Insertion der gleichen *KAN*-Kassette generiert wurden, konnte der Genotyp der entstandenen Haploiden nicht anhand phänotypischer Eigenschaften abgeleitet werden. Um entsprechende Deletionen nachzuweisen, wurde eine diagnostische PCR (siehe 2.3.3.1) durchgeführt. Dabei erfolgte der Nachweis der Deletion des ORFs durch die Verwendung eines Primers, welcher in der *KAN*-Deletionskassette bindet (for-Primer) sowie eines Primers, welcher 3'-seitig des entsprechenden ORFs (rev-Primer) bindet. Die PCR-Produkte wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 15).

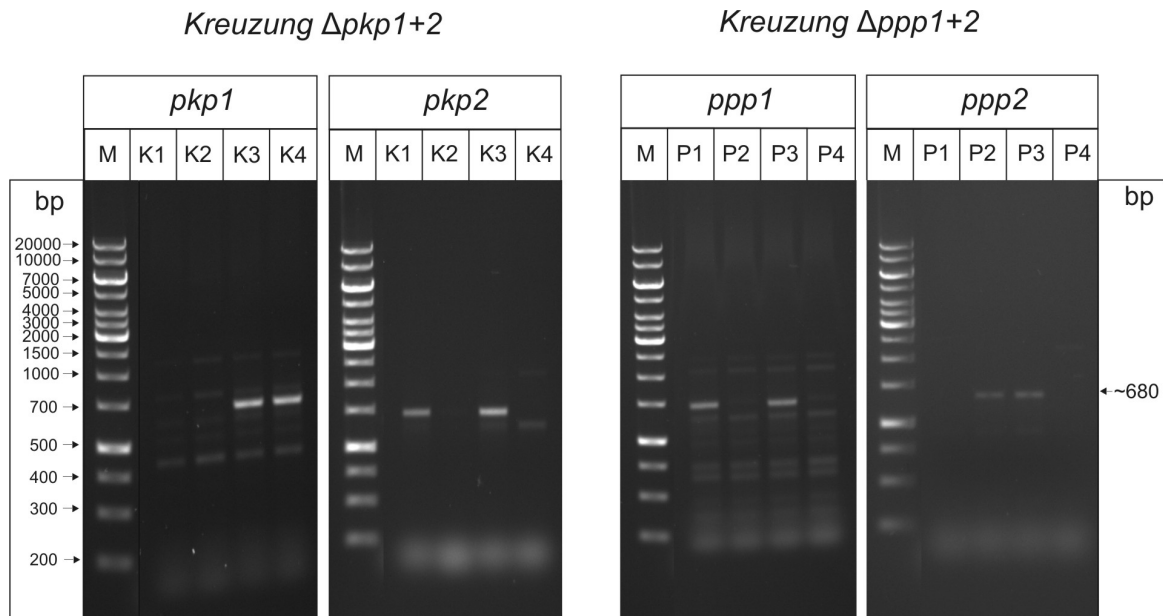


Abb. 15 Diagnostische PCR zum Deletionsnachweis der *PKP*- bzw. *PPP*-ORFs.

Die Kinase- bzw. Phosphatase-Einzeldelentionsstämme wurden gekreuzt und die Diploiden sporuliert. Die diagnostische PCR zum Nachweis der entsprechenden Gendeletionen wurde nach der Präparation einer DNA-Rohfraktion aus den Sporen je einer Tetrade (K1-4 bzw. P1-4) durchgeführt. Die verwendeten Primer binden in der *KAN*-Deletionskassette (for-Primer, # 17) sowie im 3'-flankierenden Bereich der entsprechenden ORFs (rev-Primer, #19 für *pkp1*, #10 für *pkp2*, #20 für *ppp1* und # 21 für *ppp2*). Je 10 μ l der PCR-Ansätze sowie 5 μ l des Markers (M; GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder) wurden in einem 0,8 %igen Agarosegel analysiert.

Durch den Nachweis eines etwa 680 bp großen PCR-Fragmentes konnte die Integration der *KAN*-Deletionskassette im entsprechenden ORF nachgewiesen werden (Abb. 15). Dabei konnte in den vier Sporen der Kinasekreuzung ($\Delta pkp1+2$) sowie der Phosphatasekreuzung ($\Delta ppp1+2$) die meiotische 2:2 Segregation der Deletionen gezeigt werden. Die vergleichsweise hohe Anzahl an Nebenbanden ist vermutlich auf die verwendete DNA-Rohfraktion sowie die nicht sehr stringent gewählten PCR-Bedingungen (insbesondere Annealingtemperatur) zurückzuführen. In der Spore K3 der Kinasekreuzung gelang es, die Deletion von *PKP1* sowie *PKP2* nachzuweisen. Dieser haploide Stamm ($\Delta pkp1+2$) wurde im Folgenden analysiert. Auch in der Tetrade der Phosphatase-Doppeldelention wurde in einer Spore (P3) das parallele Vorliegen der Deletion beider *PPPs* nachgewiesen, so dass dieser Stamm ($\Delta ppp1+2$) für die folgenden Analysen verwendet werden konnte.

3.2.5.2 PDH-Aktivitätsmessung in $\Delta pkp1+2$ und $\Delta ppp1+2$

Für die biochemische Messung der PDH-Aktivität in den Doppeldelentionen wurden hochreine Mitochondrien nach Kultivierung auf YPE präpariert und die Messung analog zu den Einzeldelentionen (vgl. 3.2.2.2) durchgeführt. Anhand des Anstieges wurde die

prozentuale Aktivität im Verhältnis zum WT errechnet (Mittelwert aus Triplikaten), welche im Balkendiagramm sowie der Tabelle in Abb. 16 dargestellt ist.

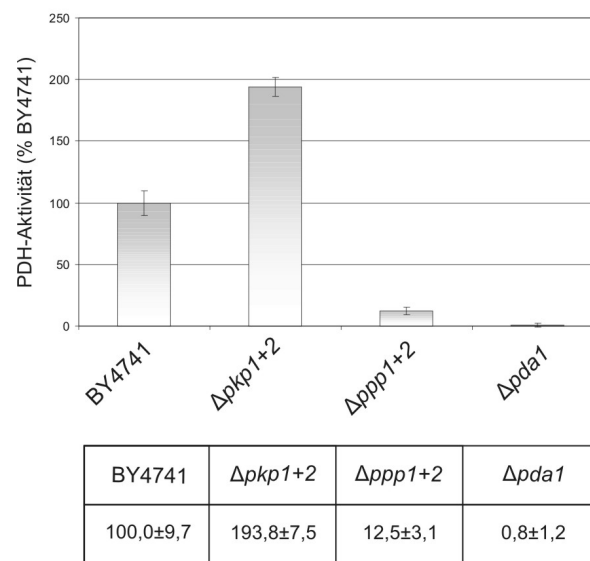


Abb. 16 Photometrischer PDH-Aktivitätsassay des WT sowie der Doppeldeletionsstämme $\Delta pkp1+2$ und $\Delta ppp1+2$.

Die PDH-Aktivität in hochreinen Mitochondrien des WT (BY4741) und der $\Delta pda1$ -Mutante sowie der Doppeldeletionsstämme $\Delta pkp1+2$ und $\Delta ppp1+2$ wurde mit einem biochemischen Assay bestimmt. Die relativen Aktivitäten (% der WT-Aktivität) wurden durch die Berechnung des linearen Anstieges der Reaktion (90 s) bestimmt und sind im Balkendiagramm bzw. in der Tabelle dargestellt. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Triplikaten von drei unabhängigen Experimenten. Entsprechende Standardabweichungen sind durch Balken bzw. \pm gekennzeichnet.

Im Stamm $\Delta pda1$ konnte keine Aktivität gemessen werden, womit die Spezifität des Assays erneut bestätigt werden kann. Die Aktivitäten der PDH in den Kinase- bzw. Phosphatase-Doppeldeletionen weichen deutlich von der WT-Aktivität ab (Abb. 16). Im $\Delta pkp1+2$ -Stamm konnte eine fast doppelt so hohe Aktivität verzeichnet werden, was für eine fehlende Inaktivierung des PDH-Komplexes aufgrund des Verlustes beider Kinasen spricht. Die nochmals um 50 % erhöhte Aktivität im Vergleich zur Einzeldelation $\Delta pkp2$ (vgl. 3.2.2.2) deutet möglicherweise auf einen additiven Effekt der Deletion beider Kinasen hin. Im Stamm $\Delta ppp1+2$ konnte lediglich eine geringe Aktivität von 12,5 % im Vergleich zum WT gemessen werden. Damit ist die Aktivität deutlich geringer als in der $PPP1$ -Deletion und liegt in dem Bereich, welche im $\Delta ppp2$ -Stamm gemessen wurde (vgl. 3.2.2.2).

3.2.5.3 Proteomanalyse und Quantifizierung von Pda1p in $\Delta pkp1+2$ und $\Delta ppp1+2$

Um den Effekt der Doppeldeletionen auf das Pda1p-Protein detailliert zu untersuchen, wurde mit den Stämmen $\Delta pkp1+2$ sowie $\Delta ppp1+2$ eine DIGE-Analyse durchgeführt.

Dazu wurden diese Stämme sowie der WT zunächst in YPE kultiviert, Mitochondrien enzymatisch präpariert und mittels Saccharose-Gradienten und NaCl-Behandlung gereinigt. Im Anschluss wurde eine 2D-DIGE (siehe 2.4.14) durchgeführt, wobei die Proben mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert und parallel in einem 2D-Gel separiert wurden. Die Quantifizierung erfolgte unter Nutzung zweier Gele unabhängiger Experimente mit der Delta2D-Software. Der Gelbereich, in welchem sich die Pda1p-Spots befinden, ist in Abb. 17A dargestellt und die Spotintensitäten sind analog zur Quantifizierung in den Einzeldelationen (vgl. 3.2.4.2) im Diagramm bzw. der Tabelle in Abb. 17B zusammengefasst.

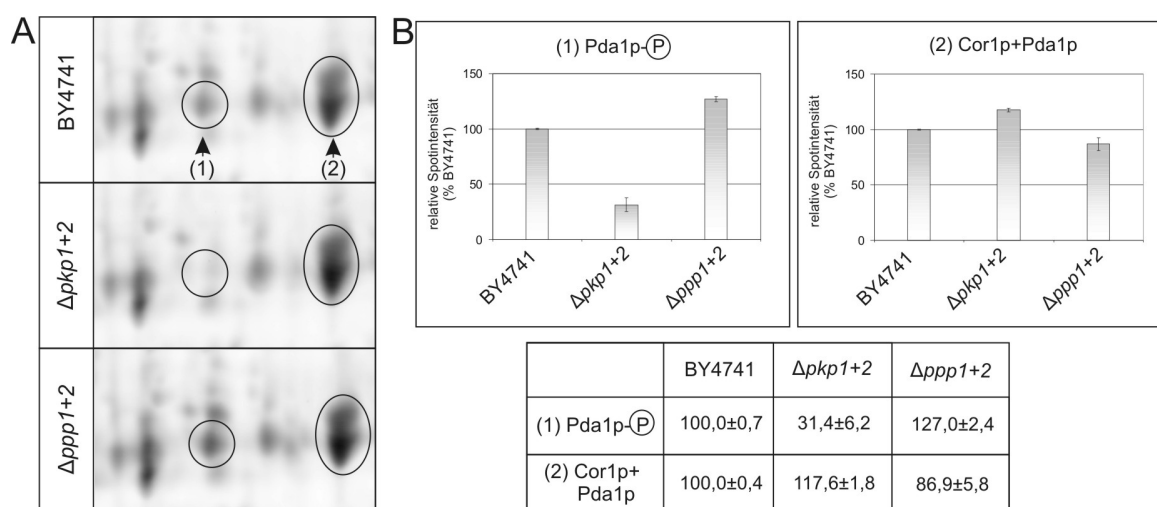


Abb. 17 2D-DIGE-Analyse (A) und Quantifizierung der Pda1p-Spots (B) im WT (BY4741) und den Stämmen $\Delta pkp1+2$ und $\Delta ppp1+2$.

Mt Proteine des WT (BY4741) und der Stämme $\Delta pkp1+2$ und $\Delta ppp1+2$ wurden mittels 2D-DIGE analysiert. Die entsprechenden Gelbereiche, in welchen sich der Pda1p-Phosphospot (1) bzw. Cor1p/Pda1p-Spot (2) befindet, sind in (A) dargestellt. Die Quantifizierung der Spots (mittleres normalisiertes Volumen, % vom WT Spot) erfolgte mittels der Delta2D-Software und ist in der Tabelle angegeben sowie in den Balkendiagrammen dargestellt (B). Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Duplikaten (Standardabweichung durch Balken bzw. \pm gekennzeichnet).

Anhand der Ausschnitte der 2D-Gele (Abb. 17A) ist bereits ersichtlich, dass der Pda1p-Phosphospot (Spot 1) im Stamm $\Delta pkp1+2$ kaum detektiert werden kann, während er im Phosphatase-Doppeldelationsstamm abundanter als im WT zu sein scheint. Bestätigt wird dieser erste Eindruck durch die Quantifizierung der Spots, welche mit der Delta2D-Software durchgeführt wurde (Abb. 17B). Im Vergleich zum WT sinkt die Abundanz des Pda1p-Phosphospots in der Kinase-Doppeldelation auf 31 %, während in $\Delta ppp1+2$ eine um 27 % stärkere Intensität detektiert werden kann.

Für Spot 2, welcher Cor1p sowie nicht-phosphoryliertes Pda1p repräsentiert, können entgegengesetzte Intensitätsänderungen verzeichnet werden (Abb. 17). Die Intensität steigt in $\Delta pkp1+2$ auf etwa 118 %, während sie in $\Delta ppp1+2$ auf ca. 87 % sinkt. Das

Ausmaß der Änderung ist nicht so deutlich wie es bei Spot 1 der Fall ist, da wahrscheinlich – wie bereits erwähnt – die Überlagerung des Pda1p durch das abundante Cor1p in diesem Spot mit der Quantifizierung interferiert.

3.2.6 Analyse der molekularen Organisation von Pkp2p und Ppp2p

Sowohl für Pkp1p als auch Ppp1p konnte eine Assoziation mit dem PDH-Komplex gezeigt werden (vgl. [78] und [63]). Um eine mögliche Interaktion von Pkp2p bzw. Ppp2p mit dem PDH-Komplex zu untersuchen, wurde die molekulare Komplexorganisation der Proteine in einer 2D-BN/SDS-PAGE untersucht. Dazu wurden Mitochondrien der Stämme Pda1-HA, Ppp2-HA und Pkp2-HA enzymatisch präpariert und die mt Proteinkomplexe in einer 3-13 %igen BN-PAGE separiert. Nach einer zweiten Dimension in einer 12 %igen SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und die immunologische Detektion mit HA- sowie Cox2p-Antikörpern durchgeführt (Abb. 18).

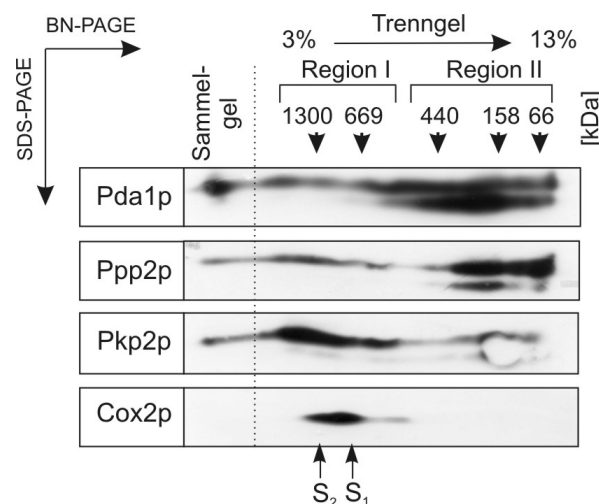


Abb. 18 Molekulare Organisation von Pda1p, Ppp2p sowie Pkp2p.

Mitochondrien von Hefestämmen, welche HA-markierte Versionen von Pda1p, Ppp2p oder Pkp2p tragen, wurden präpariert, 200 µg mit Digitonin lysiert und die mt Proteinkomplexe in einem 3-13 %igen BN-Gel separiert. Die Trennung der Untereinheiten der Proteinkomplexe erfolgte im Anschluss in einer denaturierenden 12 %igen SDS-PAGE. Die immunologische Detektion wurde mit HA- sowie Cox2p-Antikörpern (Kontrolle) durchgeführt. Das angegebene Molekulargewicht (in kDa) wurde anhand des in der ersten Dimension verwendeten Nativmarkers („*High Molecular Weight Calibration kit*“) ermittelt. Die Cox2p-Signale S₁ und S₂ repräsentieren die Position der Superkomplexe der Atmungskettenkomplexe III und IV (S₁: [III]₂ [IV]₁ bei ~850 kDa; S₂: [III]₂ [IV]₂ bei ~1100 kDa) und wurden als interner Größenstandard in den Gelen verwendet. Die Regionen I und II sind im Text erläutert.

Pda1p kann über einen weiten Molekulargewichtsbereich des nativen Geles detektiert werden (Abb. 18, oberes Feld). Aufgrund der Größe von etwa 8-9 MDa [41], welche die Porengröße des 3 %igen Geles übersteigt, wird der voll-assemblierte PDH-Komplex im Sammelgel zurückgehalten. Vermutlich dissoziiert Pda1p auch während der

Elektrophorese teilweise von diesem Komplex ab, was die kontinuierlichen Signale über den gesamten Molekulargewichtsbereich erklären könnte. Es können jedoch auch fokale Akkumulationen in einem Bereich von etwa 500-2000 kDa (Abb. 18, Region I) bzw. 100-500 kDa (Abb. 18, Region II) detektiert werden, welche möglicherweise stabilere Subkomplexe bzw. Assemblierungsstufen des PDH-Komplexes darstellen. Am äußeren rechten Rand werden vermutlich die Pda1p-Monomere (~ 50 kDa) detektiert.

Das Separationsprofil der Phosphatase Ppp2p und Pkp2p (Abb. 18, mittleres Feld) ähnelt stark dem von Pda1p und deutet damit auf eine mögliche Interaktion dieser Kinase bzw. Phosphatase mit dem PDH-Komplex hin. Pkp2p und Ppp2p scheinen dabei sowohl im hochmolekularen Bereich am voll-assemblierten PDH-Komplex als auch im Bereich der putativen PDH-Subkomplexe (Region I bzw. II) vorzuliegen. Die im niederen Molekulargewichtsbereich befindliche weiße Stelle bei der Detektion von Pkp2p-HA ist vermutlich auf einen methodischen Fehler beim Western Blot zurückzuführen.

Der Vergleich der Separationsprofile von Pkp2p und Ppp2p legt eine ähnliche, aber nicht identische molekulare Organisation der Proteine nahe. Hinsichtlich der Konzentrationsverteilung der Signale gibt es bei Ppp2p und Pkp2p Unterschiede. Pkp2p scheint in den Komplexen mittleren Molekulargewichtes (Abb. 18, Region I) vermehrt vorzuliegen, während Ppp2p vor allem auf Höhe der kleineren Komplexe (Abb. 18, Region II) detektiert wird. Möglicherweise deutet dies auf eine Assoziation der regulatorischen Proteine mit verschiedenen Assemblierungsstufen des Komplexes hin.

3.2.7 Analyse der molekularen Organisation des PDH-Komplexes in $\Delta pkp2$ und $\Delta ppp2$

Wie in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, beeinflusst die Deletion von *PKP1* interessanterweise nicht nur den Phosphorylierungszustand von Pda1p, sondern auch die molekulare Organisation des PDH-Komplexes (vgl. [78] und [63]). Postuliert wird deshalb eine zusätzliche Rolle dieser Kinase bei der Assemblierung des Komplexes. Im Gegensatz dazu konnte im $\Delta ppp1$ -Stamm im Vergleich zum WT kein Unterschied hinsichtlich der Organisation des PDH-Komplexes detektiert werden.

Im Folgenden sollte die molekulare Organisation des PDH-Komplexes in den Deletionsstämmen $\Delta ppp2$ und $\Delta pkp2$ mittels einer 2D-BN/SDS-PAGE untersucht werden. Um Pda1p immunologisch detektieren zu können wurden Stämme verwendet, in welchen das Protein fusioniert mit einem HA-Epitop-*tag* vorliegt. Mitochondrien dieser Stämme wurden enzymatisch präpariert, mit Digitonin lysiert und die Proteinkomplexe in einem 3-13 %igen BN-Gel separiert (siehe 2.4.13). Im Anschluss wurde eine zweite Dimension (12 %ige SDS-PAGE) durchgeführt, die Gele geblottet und mit HA- sowie Cox2p-Antikörpern detektiert (Abb. 19).

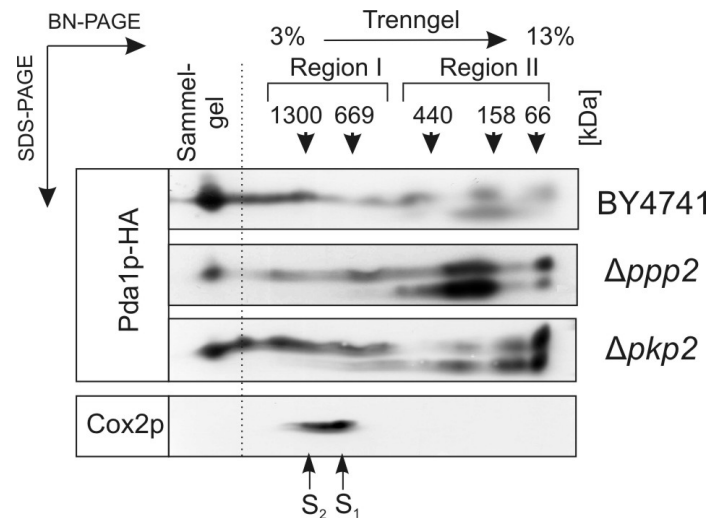


Abb. 19 Molekulare Organisation des PDH-Komplexes im WT (BY4741) sowie den Deletionsstämmen $\Delta ppp2$ und $\Delta pkp2$.

200 μ g Mitochondrien des WT (BY4741) sowie der Deletionsmutanten $\Delta ppp2$ und $\Delta pkp2$ wurden lysiert und die mt Proteinkomplexe in einem 3-13 %igen BN-Gel separiert. Die Trennung der Untereinheiten der Proteinkomplexe erfolgte im Anschluss in einer 12 %igen SDS-PAGE. Die immunologische Detektion von Pda1p erfolgte mit HA-Antikörpern; Cox2p wurde als interne Kontrolle detektiert. Das angegebene Molekulargewicht (in kDa) wurde anhand des in der ersten Dimension verwendeten Nativmarkers („High Molecular Weight Calibration kit“) ermittelt. Die Cox2p-Signale S_1 und S_2 repräsentieren die Position der Superkomplexe der Atmungskettenkomplexe III und IV (S_1 : [III]₂ [IV]₁ bei ~850 kDa; S_2 : [III]₂ [IV]₂ bei ~1100 kDa) und wurden als interner Größenstandard in den Gelen verwendet. Die Regionen I und II sind im Text erläutert.

Wie bereits gezeigt, kann Pda1p im WT (Abb. 19, oberes Feld) über einen weiten Molekulargewichtsbereich detektiert werden. Der Hauptanteil des Proteins liegt im vollständig assemblierten PDH-Komplex im Sammelgel vor und weniger konzentriert auch in Subkomplexen geringeren Molekulargewichts (Abb. 19, Region I+II). Das Separationsprofil von Pda1p in den Deletionsstämmen $\Delta ppp2$ und $\Delta pkp2$ überlappt mit dem des WT, so dass zumindest von einer ähnlichen Organisation des PDH-Komplexes ausgegangen werden kann. Der voll-assemblierte Komplex scheint allerdings im Stamm $\Delta ppp2$ etwas geringer konzentriert zu sein als im WT, während sich Subkomplexe in Region II anreichern. Bei Deletion von *PKP2* hingegen scheinen die Subkomplexe im höheren Molekulargewichtsbereich (Abb. 19, Region I) etwas abundanter zu sein.

Diese Änderungen im Vergleich zum WT könnten auf einen leichten Effekt der Gendeletionen auf die Stabilität und/oder Assemblierung des PDH-Komplexes hindeuten. Insbesondere im Falle der *PPP2*-Deletion könnte dies auf die stark reduzierte PDH-Enzymaktivität (vgl. 3.2.2.2) und eine damit einhergehende Destabilisierung zurückzuführen sein. Ein drastischer Effekt wie die fast ausschließliche Präsenz von Pda1p in Subkomplexen der Region I im Deletionsstamm $\Delta pkp1$ [63], konnte in $\Delta ppp2$ oder $\Delta pkp2$ jedoch nicht beobachtet werden.

3.2.8 Interaktionsanalyse von Pkp1p und Pkp2p

Die PDH-Kinasen Pkp1p und Pkp2p wiesen bei Analyse der molekulen Organisation in der 2D-BN/SDS-PAGE ein ähnliches Separationsprofil auf (3.2.6 bzw. [63]), was auf eine physikalische Interaktion der beiden Proteine hinweisen könnte. Zusätzlich deuten Untersuchungen des entsprechenden Doppeldeletionsstammes einen additiven Effekt des Verlustes beider Kinasen an (vgl. 3.2.5). Eine mögliche physikalische Interaktion von Pkp1p und Pkp2p *in vivo* wurde im Folgenden mit der *Tandem affinity purification* (TAP) - Methode sowie mittels Co-Immunopräzipitation analysiert. Dafür wurden zunächst Stämme hergestellt, welche Pkp1p-TAP bzw. Pkp1-cMyc und Pkp2p-HA parallel exprimieren. Dies wurde durch die C-terminale Fusion des *PKP2*-ORFs mit einem HA-Epitop-*tag* in den Stämmen Pkp1-TAP und Pkp1-cMyc erreicht. Die korrekte Integration wurde mittels diagnostischer PCR und Western Blot verifiziert (Daten nicht gezeigt). Für die TAP-Methode (siehe 2.4.8) wurden 1 mg Mitochondrien des Stammes Pkp1-TAP/Pkp2-HA lysiert und das Lysat mit IgG-Agarose inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde der TEV-Verdau durchgeführt und anschließend der Überstand mit der zweiten Affinitätsmatrix (Calmodulin-Sepharose) inkubiert. Während der Reinigungsschritte wurden Aliquots genommen und diese mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abb. 20A). Für die Co-Immunopräzipitation (siehe 2.4.7) wurden je 1 mg mt Protein des Stammes Pkp1-cMyc/Pkp2-HA mit immobilisierter HA- bzw. cMyc-Antikörpern inkubiert. Nach mehrfachem Waschen der Matrix wurden die gebundenen Proteine mittels Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 20B).

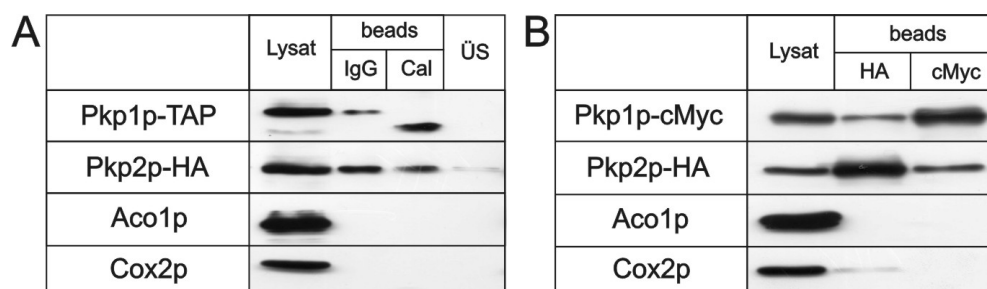


Abb. 20 Interaktionsnachweis der PDH-Kinasen Pkp1p und Pkp2p mittels TAP-Methode (A) und Co-Immunopräzipitation (B).

Für die TAP-Methode (A) wurden 1 mg Mitochondrien des Stammes Pkp1-TAP/Pkp2-HA lysiert (Spur 1: Lysat, 20 µg) und mit der ersten Affinitätsmatrix inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde ein Aliquot (etwa 1/10 des Gesamtvolumens) der IgG-beads als Probe genommen (IgG; Spur 2). Nach dem TEV-Verdau wurde der Überstand mit der zweiten Affinitätsmatrix (Calmodulinbeads) inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Elution mit 2 % SDS (Cal; Spur 3). Nicht-gebundene Proteine im Überstand wurden mittels TCA gefällt und ebenfalls aufgetragen (ÜS; Spur 4). Die Proben wurden in einem 12 %igen SDS-Gel separiert und in der Western Blot-Analyse mittels TAP- und HA-Antikörpern analysiert. Für die Co-Immunopräzipitation (B) wurden 1 mg Mitochondrien des Stammes Pkp1-cMyc/Pkp2-HA lysiert (Spur 1: Lysat, 30 µg) und mit immobilisierten HA- bzw. cMyc-Antikörpern inkubiert. Nach dem Waschen der Matrices wurden gebundene Proteine mit 2 % SDS eluiert (Spur 2: HA, Spur 3: cMyc). Die Western Blot-Analyse erfolgte mit cMyc- bzw. HA-Antikörpern. Die Spezifität der Interaktionsanalysen wurde durch die Detektion von Aco1p und Cox2p verifiziert.

Als Beleg der Funktionalität des Epitop-*tags* sowie der methodischen Eignung der Lyse- und Präzipitationsbedingungen wurde das mit dem TAP-*tag* fusionierte Pkp1p (~ 65 kDa) immunologisch detektiert. Das Protein konnte sowohl an der IgG- als auch der Calmodulin-Sepharose nachgewiesen werden (Abb. 20A). Das reduzierte Molekulargewicht des TAP-getaggten Pkp1p in Spur 3 (Calmodulin-Sepharose) resultiert aus dem Verlust der Protein A-Domäne (~16 kDa) durch den TEV-Verdau. Im Überstand nach der Bindung (Spur 4) kann Pkp1p-TAP nicht mehr detektiert werden, was für eine sehr effiziente Präzipitation des Proteins an der Matrix spricht. Pkp2p-HA wurde interessanterweise an beiden Matrices copräzipitiert. Auch hier kann im Überstand nach der Bindung nur ein schwaches Signal detektiert werden. Für eine hohe Spezifität dieser Interaktionsanalyse spricht der fehlende Nachweis der mt Proteine Aco1p und Cox2p an beiden Matrices (Abb. 20A, Spur 2+3).

Die mögliche Interaktion wurde durch eine Co-Immunopräzipitation unabhängig verifiziert (Abb. 20B). Dafür wurden Mitochondrien des Stammes Pkp1-cMyc/Pkp2-HA lysiert (Spur 1) und mit immobilisierten HA- (Spur 2) bzw. cMyc- (Spur 3) Antikörpern inkubiert. Im Eluat der HA-Sepharose konnte neben dem HA-getaggten Pkp2p ebenso Pkp1p-cMyc nachgewiesen werden. Im reziproken Experiment konnte durch die cMyc-Sepharose sowohl Pkp1p-cMyc als auch Pkp2p-HA präzipitiert werden (Abb. 16B, Spur 3). Andere mt Proteine wie Aco1p oder Cox2p können in den Eluaten der Sepharosen nicht nachgewiesen werden, wodurch eine hohe Spezifität der Präzipitationsbedingungen gezeigt werden kann.

Beide Experimente legen eine physikalische Interaktion der beiden PDH-Kinasen Pkp1p und Pkp2p *in vivo* nahe, möglicherweise durch die Assemblierung zu Heterooligomeren. Es kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um eine direkte oder indirekte Interaktion – vermittelt über andere assoziierte Proteine – handelt.

3.3 Analysen zur Funktion der putativen mt Kinase Sat4p

Für die initialen DIGE-Proteomstudien (Abschnitt 3.1) wurde als Ansatz die Analyse von Deletionsmutanten gewählt, um mögliche Informationen über die Funktion bzw. Zielprotein(e) der entsprechenden Kinasen bzw. Phosphatasen zu erhalten. Für einen großen Anteil der verwendeten Stämme konnten allerdings keine signifikanten bzw. spezifischen Effekte auf das mt Proteom festgestellt werden.

Exemplarisch wurde für die Kinase Sat4p eine andere Herangehensweise durch die Verwendung einer Überexpressionsmutante gewählt. Insbesondere für die funktionelle Untersuchung regulatorischer Proteine wie Kinasen ist solch ein Ansatz durchaus geeignet [125], da die Modifikationen häufig transient sind und die Detektion möglicher

Konsequenzen oft stark von den gewählten Wachstumsbedingungen abhängig ist. Zunächst wurde jedoch die mögliche mt Lokalisierung von Sat4p experimentell überprüft.

3.3.1 Lokalisationsstudie von Sat4p

Bioinformatische Analysen der Kinase Sat4p ergeben mit 96 % (MITOPROT, [109]) bzw. 61 % (PSORT, [126]) eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für einen möglichen Import des Proteins in das mt Kompartiment. Bisher wurden allerdings noch keine experimentellen Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von Sat4p durchgeführt.

Um das Protein immunologisch nachweisen zu können, wurde dieses zunächst C-terminal mit einem cMyc-Epitop-*tag* fusioniert. Die korrekte Integration in das Genom wurde mittels einer diagnostischen PCR und die Expression durch Western Blot nachgewiesen [81]. Die Funktionalität des getaggten Proteins wurde durch eine Wachstumsanalyse des entsprechenden Stammes auf Hochsalzmedium, in welchem der Deletionsstamm $\Delta sat4$ ein vermindertes Wachstum aufweist, untersucht (Abb. 21A). Für die Lokalisationsstudie wurden von diesem Stamm Sat4-cMyc Mitochondrien enzymatisch präpariert und durch Saccharose-Gradientenzentrifugation und NaCl-Behandlung unter osmotisch stabilisierten Bedingungen gereinigt (vgl. 2.4.1.3). Während der Präparation wurden Proben genommen, mittels SDS-PAGE separiert und im Anschluss mit cMyc-sowie Kontroll-Antikörpern immunologisch detektiert (Abb. 21B).

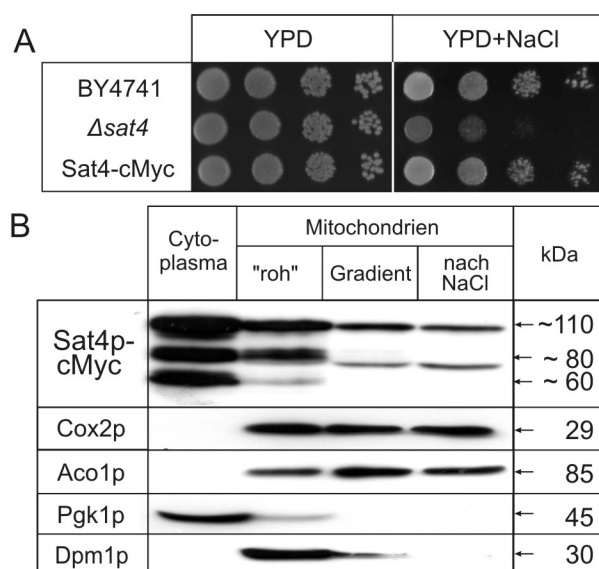


Abb. 21 Lokalisationsstudie der Kinase Sat4p.

Für den Nachweis der Funktionalität der cMyc-getaggten Variante von Sat4p wurden Zellen des WT, der Deletionsmutante $\Delta sat4$ und des Stammes Sat4-cMyc in einer Verdünnungsreihe (10^4 - 10^1 Zellen) auf YPD bzw. YPD+1 M NaCl (Festmedium) aufgetropft (**A**). Für die Lokalisationsstudie (**B**) wurden Mitochondrien des Stammes Sat4-cMyc enzymatisch präpariert und anschließend gereinigt. 50 µg cytoplasmatisches (Spur 1) und mt Protein vor (Spur 2) bzw. nach (Spur 3) der Saccharose-Gradientenzentrifugation und des Waschschrtes mit 1 M NaCl (Spur 4) wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE separiert. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Analyse der Fraktionen mit cMyc- sowie den angegebenen Kontroll-Antikörpern.

In der Wachstumsanalyse (Abb. 21A) auf Vollmedium (YPD) weisen sowohl der Deletionsstamm $\Delta sat4$ als auch der Stamm Sat4-cMyc ein zum WT (BY4741) vergleichbares Wachstum auf. Die Zugabe von 1 M NaCl führt – in Übereinstimmung mit Literaturdaten [110,127] – zu einem verminderten Wachstum von $\Delta sat4$. Der Stamm Sat4-cMyc hingegen wächst vergleichbar zum WT auf YPD+NaCl. Dieser Befund spricht dafür, dass der fusionierte Epitop-*tag* nicht mit der Funktion des Proteins interferiert.

In der Lokalisationsstudie (Abb. 21B) konnten die mt lokalisierten Proteine Aco1p (Matrix) und Cox2p (innere mt Membran) ausschließlich in den mt Fraktionen (Spur 2-4) nachgewiesen werden. Die cytoplasmatische, mt assoziierte Phosphoglyceratkinase (Pgc1p) kann neben dem Cytoplasma auch noch in geringer Konzentration in den ungereinigten Mitochondrien nachgewiesen werden. In den gereinigten Fraktionen kann aber selbst bei Überexposition des Filmes kein Signal mehr detektiert werden (nicht gezeigt). Dpm1p als hauptsächlich im ER lokalisiertes Protein wird in der Präparation sogar in der Mitochondrienfraktion angereichert (Spur 2), kann aber durch die Gradientenzentrifugation und insbesondere den zusätzlichen Waschschriff mit NaCl (Spur 4) deutlich abgereichert werden. Die Kontrolldetektionen zeigen, dass während der Präparation hochreine Mitochondrien gewonnen werden konnten.

Bei der Detektion von Sat4p-cMyc (Abb. 21B, obere Reihe) konnten in der Cytoplasmafraktion drei Signale ähnlicher Intensität bei etwa 60, 80 und 110 kDa nachgewiesen werden, welche sich jeweils aus wenigstens zwei Banden zusammensetzen. Das Signal bei etwa 80 kDa könnte das mature Protein repräsentieren, da Sat4p fusioniert mit dem cMyc-*tag* ein theoretisches Molekulargewicht von 77 kDa besitzt. Bei der 60 kDa-Bande handelt es sich vermutlich um ein proteolytisches Abbauprodukt, da es während der durchgeführten Untersuchungen in sehr unterschiedlichen Intensitäten nachgewiesen wurde. Denkbar wäre jedoch auch, dass es sich bei dieser sowie der 110 kDa-Bande um eine posttranslational modifizierte Isoform des Proteins handelt. Eine detailliertere Analyse der verschiedenen Migrationsformen von Sat4p ist in Abschnitt 3.3.2 beschrieben.

Obgleich Sat4p überwiegend in der Cytoplasmafraktion (Abb. 21B, Spur 1) nachgewiesen wurde, kann das Protein auch in allen mt Fraktionen detektiert werden (Spur 2-4). Interessanterweise ändert sich das Bandenmuster in der mt Rohfraktion und noch deutlicher in den gereinigten Mitochondrien (Spur 3+4), in welcher nur noch die 110 kDa-Isoform sowie die untere 80 kDa-Bande nachgewiesen werden können. Letztere könnte dem maturen mt Protein entsprechen, welches durch das Abspalten einer potentiellen mt Targetingsequenz um einige Aminosäuren verkürzt wird. Die Bande bei 60 kDa scheint hingegen eine cytoplasmatische Sat4p-Isoform zu repräsentieren.

Die Ergebnisse der Lokalisationsstudie zeigen, dass es sich bei Sat4p um ein dual lokalisiertes Protein handelt mit zumindest teilweiser Lokalisation im Mitochondrium. Des Weiteren weist Sat4p bei Separation mittels SDS-PAGE verschiedene Migrationsformen auf, welche im Folgenden genauer analysiert werden sollen.

3.3.2 Analyse der Sat4p-Proteinisoformen

Die in der Lokalisationsstudie detektierten Proteinformen könnten möglicherweise auf posttranslationale Modifikationen von Sat4p hinweisen. Zur weiteren Analyse wurde zunächst die Sat4p-Sequenz bioinformatisch näher betrachtet. Besonders auffällig war die bemerkenswerte Anzahl von 16 Cystein-Resten und die Vorhersage von acht möglichen Disulfidbrücken (DiANNA; [128]). Eine Behandlung der Proben mit verschiedenen reduzierenden Agenzien (Abb. 22A) wurde durchgeführt um zu testen, ob es sich bei den Banden möglicherweise um verschiedene Oxidationsstufen des Proteins handelt. Des Weiteren geben *in silico* Vorhersagen (z.B. Prosite Scan; [129]) eine Reihe putativer Modifikationsstellen an, insbesondere für Phosphorylierungen. Dies wurde näher durch eine Behandlung mit λ -Phosphatase untersucht (Abb. 22B).

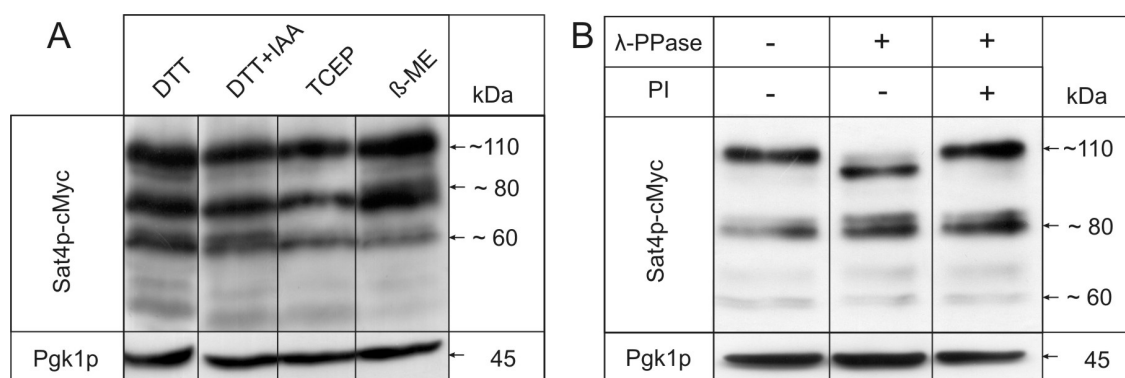


Abb. 22 Einfluss verschiedener reduzierender Agenzien (A) sowie einer λ -Phosphatasebehandlung (B) auf die Migrationsformen von Sat4p-cMyc.

Für den Test verschiedener reduzierender Agenzien (**A**) wurden jeweils 50 μ g Gesamtprotein in 6x Laemmli-Probenpuffer mit 100 mM DTT (Spur 1), 100 mM DTT + 15 mM Iodoacetamid (IAA; Spur 2), 50 mM TCEP (Spur 3) oder 5 % β -Mercaptoethanol (β -ME; Spur 4) aufgenommen. Die Separation der Proteinproben erfolgte in einer 10 %igen SDS-PAGE. Für die Phosphatasebehandlung (**B**) wurde pro Ansatz 50 μ g Gesamtprotein des Stammes Sat4-cMyc verwendet und ohne (Spur 1) bzw. mit λ -PPase in Ab- (Spur 2) oder Anwesenheit (Spur 3) von Phosphataseinhibitoren (PI) inkubiert. Die Separation der Proben erfolgte in einer 7,5 %igen SDS-PAGE. Nach dem Gellauf wurden die Proteine jeweils auf eine PVDF-Membran transferiert und mit cMyc-Antikörpern detektiert. Die Detektion von Pgk1p diente als Ladekontrolle.

Für einen Test verschiedener reduzierender Agenzien (Abb. 22A) wurden Gesamtproteinproben von Sat4-cMyc mit dem regulär verwendeten DTT (Spur 1) sowie TCEP (Spur 3) und β -Mercaptoethanol (Spur 4) versetzt. Außerdem wurde in einer Probe an die DTT-Behandlung (5 min, 95 °C) zusätzlich eine Inkubation für 10 min bei RT mit Iodoacetamid angeschlossen (Spur 2). Dieses sollte reduzierte Disulfidbrücken

alkylieren und damit eine mögliche Reoxidation verhindern. In allen Proben konnte nach der SDS-PAGE Separation ein ähnliches Bandenmuster für Sat4p-cMyc detektiert werden. Es finden sich wieder drei Hauptsignale bei etwa 60, 80 und 110 kDa sowie einige schwächere Banden von geringerem Molekulargewicht, bei welchen es sich vermutlich um proteolytische Abbauprodukte handelt. Die Ergebnisse legen nahe, dass die verschiedenen Migrationsformen nicht aufgrund unterschiedlicher Oxidations- oder Faltungsformen des Proteins entstehen.

Um eine mögliche Phosphorylierung von Sat4p zu untersuchen, wurden Gesamtproteinproben mit λ -Phosphatase behandelt (Abb. 22B). Die Proben wurden nach der Behandlung in einem 7,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt, um eine bessere Auflösung der vergleichsweise hochmolekularen Sat4p-Signale zu erlangen. Die Zugabe der λ -Phosphatase führte zu keiner Veränderung der Banden zwischen 60 und 80 kDa. Interessanterweise kommt es durch die Behandlung aber zu einer Verschiebung der 110 kDa-Bande um etwa 10 Da (Spur 2). Diese Abnahme im apparenten Molekulargewicht ist spezifisch auf die Wirkung der λ -Phosphatase zurückzuführen, da bei Inkubation ohne diese (Spur 1) sowie mit Phosphatase und Inhibitoren (Spur 3) keine derartige Veränderung festzustellen ist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei Sat4p um ein Phosphoprotein handelt. Es blieben jedoch auch nach der Behandlung mindestens drei verschiedene Laufformen von Sat4p-cMyc nachweisbar. Somit kann nicht abschließend geklärt werden, in welcher Art und Weise oder durch welche Modifikationen sich die verschiedenen Sat4p-Isoformen unterscheiden.

3.3.3 Klonierung einer SAT4-Überexpressionsmutante

Die zumindest partielle mt Lokalisierung von Sat4p wirft die Frage auf, welche funktionelle Rolle die Kinase in den Mitochondrien spielen könnte. Bei der Untersuchung des Einflusses der Deletion von *SAT4* konnte in initialen Untersuchungen (vgl. 3.1) kein signifikanter Einfluss auf das mt Proteom gezeigt werden. Für die weiteren Analysen sollte nun ein Stamm, welcher *SAT4* überexprimiert, hergestellt werden. Dafür wurde der *TET*-Promotor gewählt, welcher nahezu unabhängig von z.B. Kultivierungsbedingungen eine konstitutiv starke Überexpression bewirkt. Der *TetO₇* - Promotor wurde 5'-seitig des *SAT4*-ORFs ins Genom integriert (schematische Darstellung des Konstruktes in Abb. 23A). Um eine Überexpression auf Proteinebene nachweisen zu können, wurde als Parentalstamm der Sat4-cMyc Stamm verwendet. Die korrekte Integration der Promotorkassette wurde mittels diagnostischer PCR (Abb. 23A) und die Überexpression von Sat4p durch eine Western Blot-Analyse (Abb. 23B) verifiziert.

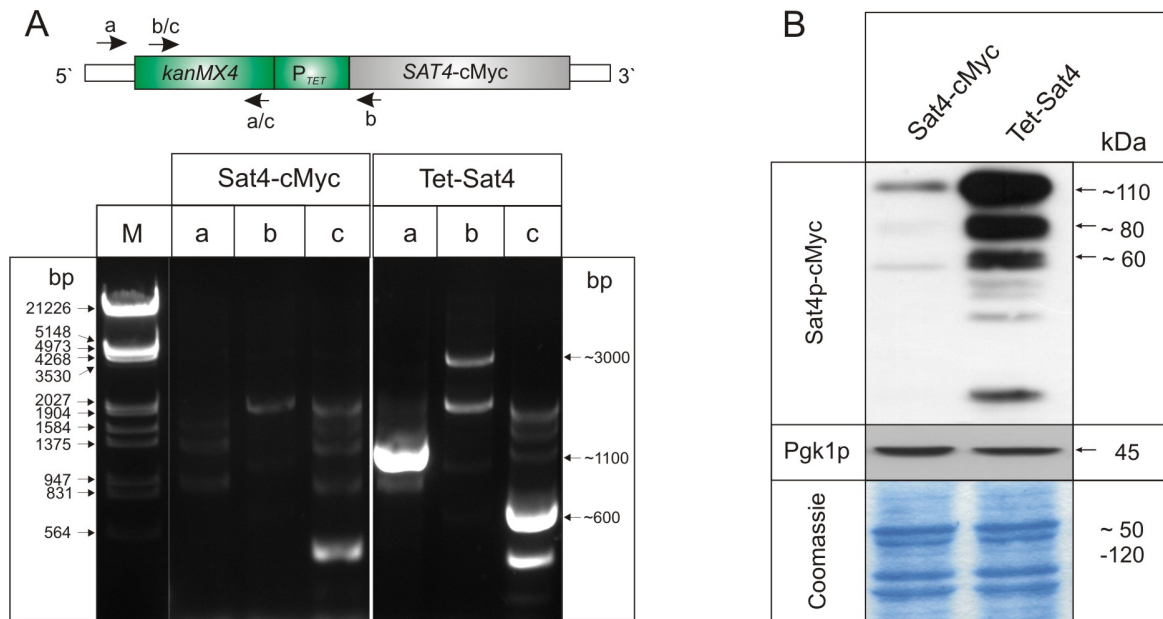


Abb. 23 Diagnostische PCR zum Nachweis der Integration des *TET*-Promotors (A) und Western Blot-Analyse zum Nachweis der Sat4p-Überexpression (B).

(A) Die genomische DNA der Stämme Sat4-cMyc (Parentalstamm) und Tet-Sat4 wurde isoliert und als Template für eine diagnostische PCR verwendet. Als Primer dienten #15+#18 (a), #16+#17 (b) sowie #17+#18 (c), deren Lage in der oberen Skizze schematisch dargestellt ist (nicht maßstabsgetreu). In einem 0,8 %igen Agarosegel wurden je 10 µl der PCR-Ansätze sowie 5 µl des Markers (M) separiert. (B) Gesamtprotein der angegebenen Stämme nach Kultivierung in YPE wurde isoliert und je 50 µg in einer 10 %igen SDS-PAGE separiert. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion mit cMyc- sowie Pgk1p-Antikörpern. Das SDS-Gel wurde nach dem Blotten mit colloidalem Coomassie gefärbt.

In der diagnostischen PCR (Abb. 23A) konnte die korrekte Integration der Promotorkassette durch die Amplifikation spezifischer Fragmente von etwa 1100 bp (PCR a), 3000 bp (PCR b) und 600 bp (PCR c) im Tet-Sat4 Stamm nachgewiesen werden. Neben diesen Fragmenten wurden einige unspezifischen Banden nachgewiesen, welche auch im Ausgangsstamm Sat4-cMyc amplifiziert wurden. Zum Nachweis einer tatsächlichen Überexpression wurde Gesamtprotein beider Stämme in einer SDS-PAGE separiert (Abb. 23B). Der Nachweis, dass äquivalente Proteinmengen aufgetragen wurden, konnte durch eine Coomassiefärbung des Geles sowie der Detektion von Pgk1p auf der Membran erbracht werden (Abb. 23B, unten bzw. Mitte). Die Proteinkonzentration von Sat4p wurde durch die Detektion mit dem cMyc-Antikörper nachgewiesen. Die Signale im Stamm Tet-Sat4 sind deutlich stärker als im Ausgangsstamm Sat4-cMyc, in welchem das Protein unter seinem nativen Promotor exprimiert wird (Abb. 23B). Es kann somit von einer starken Überexpression des Proteins ausgegangen werden. Das Bandenmuster ähnelt dem bereits in den vorangegangenen Analysen (vgl. 3.3.1 bzw. 3.3.2) detektierten, mit drei Hauptsignalen bei 60, 80 und 110 kDa. In der Spur von Tet-Sat4 können zusätzlich einige Banden geringeren Molekulargewichtes nachgewiesen werden, bei welchen es sich vermutlich um proteolytische Abbauprodukte handelt.

Um mögliche phänotypischen Auswirkungen einer Überexpression von *SAT4* zu untersuchen, wurde das Wachstum des WT (BY4741), der Deletionsmutante sowie des Tet-Sat4 Stammes auf verschiedenen Medien untersucht (Abb. 24).

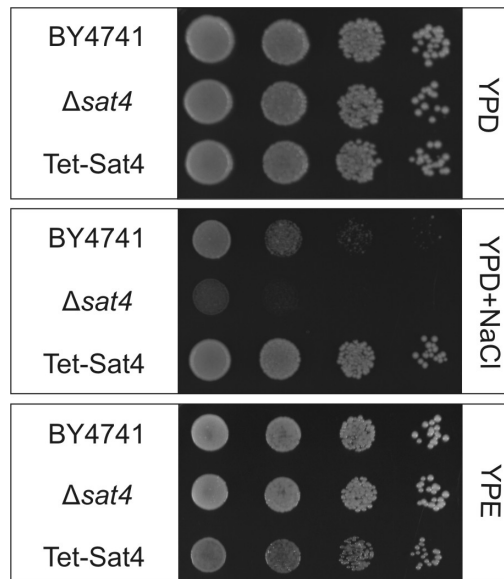


Abb. 24 Wachstumsanalyse des WT (BY4741) und der Stämme $\Delta sat4$ und Tet-Sat4.

Für die phänotypische Analyse wurden Zellen der angegebenen Stämme in einer Verdünnungsreihe (10⁴ - 10¹ Zellen) auf YPD, YPD+1 M NaCl und YPE (Festmedium) aufgetropft. Die Dokumentation erfolgte nach einer Inkubation bei 30 °C für zwei (YPD) bzw. vier (YPD+NaCl, YPE) Tage.

Auf Vollmedium mit Glukose (Abb. 24, YPD) zeigen alle Stämme ein ähnlich gutes Wachstum. Wie bereits beschrieben [110,127], führt die Zugabe von 1 M NaCl (Abb. 24, YPD+NaCl) zu einem verminderten Wachstum von $\Delta sat4$. Der Tet-Sat4 Stamm hingegen kann auf diesem Medium sogar besser wachsen als der WT. Dies wurde auch schon für die *SAT4*-Überexpression unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors gezeigt [110] und bestätigt die funktionelle Überexpression von *SAT4* im konstruierten Stamm. Auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie YPE (Abb. 24, unten) wächst der Deletionsstamm ähnlich dem WT. Interessanterweise weist Tet-Sat4 auf diesem Medium ein etwas vermindertes Wachstum auf, was möglicherweise auf eine Störung des respiratorischen Metabolismus hindeuten könnte.

3.3.4 Komparative Analyse des mt Proteoms im WT und Tet-Sat4

Um der Frage nachzugehen, ob Sat4p eine Funktion in den Mitochondrien besitzt, wurde in den initialen DIGE-Versuchen (siehe 3.1) bereits der Einfluss der Deletion ($\Delta sat4$) auf das mt Proteom analysiert. Dabei konnten allerdings keine deutlich abweichenden Spotunterschiede im Vergleich zum WT detektiert werden.

Um durch eine inverse Herangehensweise gegebenenfalls Hinweise auf Funktionen von Sat4p zu erhalten, wurde eine komparative Proteomanalyse des WT sowie des SAT4-Überexpressionsstammes durchgeführt. Dazu wurden hochreine Mitochondrien beider Stämme isoliert (siehe 2.4.1), mit Cy3 (WT) bzw. Cy5 (Tet-Sat4) markiert und simultan in einer 2D-IEF/SDS-PAGE (siehe 2.4.14) separiert. Nach der Detektion der Spots im Fluoreszenzscanner (Abb. 25A) wurde das Gel mit colloidalem Coomassie gefärbt (Abb. 25B).

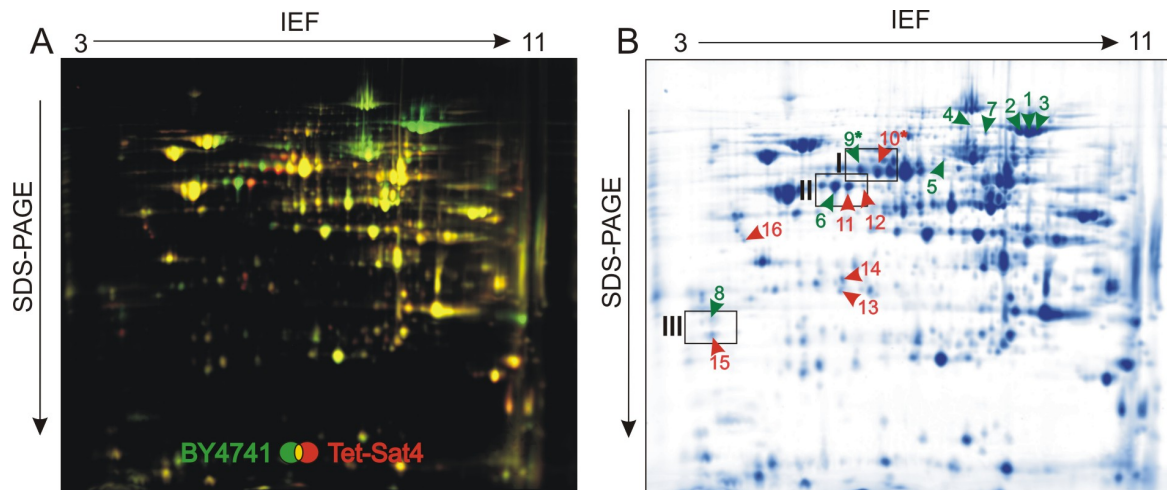


Abb. 25 2D-DIGE mit Proteine des WT (BY4741) und des Stammes Tet-Sat4.

Mitochondrien beider Stämme nach Kultivierung auf YPE wurden enzymatisch isoliert und gereinigt. Je 50 µg mt Protein wurden mit Cy3 (BY4741, grün) bzw. Cy5 (Tet-Sat4, rot) markiert und in einer nicht-linearen IEF (pH 3-11) gefolgt von einer 12 %igen SDS-PAGE separiert. Ein *Overlay*-Bild der im Fluoreszenzscanner aufgenommenen Bilder ist in (A) gezeigt. Im Anschluss wurde das Gel mit colloidalem Coomassie gefärbt (B). Die gekennzeichneten Spots wurden mittels MS identifiziert (vgl. Tab. 3). Proteinspots mit geringerer Abundanz in Tet-Sat4 sind grün markiert und Spots mit höherer Abundanz sind rot hervorgehoben. Die umrahmten Bereiche (I-III) sind in Abb. 26 vergrößert dargestellt und im Text erläutert.

Bei der Auswertung der Fluoreszenzbilder in der Delta2D-Software konnten auf dem Fusionsbild 587 Spots detektiert werden. 16 Spots des mt Proteoms im Tet-Sat4-Stamm waren im Vergleich zum WT signifikant mindestens 2,5-fach verändert ($p < 0,05$; Mittelwerte aus Duplikaten). Diese Spots (markiert in Abb. 21B) wurden aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten und mittels MS identifiziert (Tab. 3). Die entsprechenden Peaklisten der MALDI-TOF-MS bzw. nanoLC-MS/MS können dem digitalen Anhang (Ordner „MS Tet-Sat4“; Tab. DA1+DA2) entnommen werden.

Tab. 3 Proteine veränderter Abundanz nach Überexpression von Sat4p.

Mt Proteine des WT und des Stammes Tet-Sat4 wurden mittels 2D-DIGE analysiert (vgl. Abb. 25). Signifikant veränderte Proteinspots (Mittelwerte aus Duplikaten; $p < 0,05$; Schwellenwert Änderung 2,5; Ausnahme * : Veränderung der Spotintensität $< 2,5$ -fach) wurden wie angegeben durch MALDI-TOF-MS oder nanoLC-MS/MS identifiziert. Angegeben sind der Name des Genes, die SwissProt-Nr. sowie die Parameter der jeweiligen MS Identifizierung. „Tet-Sat4/ WT“ bezeichnet den Quotient der Intensitäten (normiertes mittleres Volumen) der entsprechenden Spots zwischen Tet-Sat4 und WT.

Spot	Gen	Swiss Prot Nr.	Protein	MS Methode	Mascot Score (PMF)	zugeordnete Peptide	Sequest Score	Anzahl sequenzierte Peptide	Sequenzabdeckung (%)	Tet-Sat4/ WT
1	ACO1	P19414	Aconitase	MALDI-TOF-MS	188	24/52			25	0,2
2	ACO1	P19414	Aconitase	MALDI-TOF-MS	211	22/45			31	0,22
3	ACO1	P19414	Aconitase	MALDI-TOF-MS	105	12/30			19	0,27
4	SDH1	Q00711	Succinatdehydrogenase Untereinheit 1	MALDI-TOF-MS	170	15/44			35	0,27
5	ICL2	Q12031	2-Methylisocitrat-Lyase	MALDI-TOF-MS	159	20/51			32	0,27
6	KGD2	P19262	KGDH-Komplex E2-Untereinheit	nanoLC-MS/MS			7132	17	58	0,32
7	LYS4	P49367	Homoaconitase	MALDI-TOF-MS	180	15/25			24	0,38
8	GCV3	P39726	<i>Glycine cleavage system</i> H -Protein	nanoLC-MS/MS			240	8	56	0,39
9*	LAT1	P12695	PDH-Komplex E2-Untereinheit	nanoLC-MS/MS			2987	22	57	0,77
10*	LAT1	P12695	PDH-Komplex E2- Untereinheit	nanoLC-MS/MS			2549	20	52	2,38
	ALD4	P46367	mt Aldehyd-Dehydrogenase	nanoLC-MS/MS			5337	30	76	
	FCJ1	P36112	<i>Formation of crista junctions</i> -Protein 1	nanoLC-MS/MS			2219	26	58	
11	KGD2	P19262	KGDH-Komplex E2- Untereinheit	nanoLC-MS/MS			3659	19	59	3,31
12	KGD2	P19262	KGDH-Komplex E2- Untereinheit	MALDI-TOF-MS	53	5/12			10	3,32
13	LSP1	Q12230	<i>Sphingolipid long chain base-responsive</i> -Protein LSP1	MALDI-TOF-MS	134	11/23			29	3,15
14	PIL1	P53252	<i>Sphingolipid long chain base-responsive</i> -Protein PIL1	MALDI-TOF-MS	119	11/25			34	3,3
15	GCV3	P39726	<i>Glycine cleavage system</i> H -Protein	nanoLC-MS/MS			249	5	52	3,95
16	LSP1	Q12230	<i>Sphingolipid long chain base-responsive</i> -Protein LSP1	MALDI-TOF-MS	67	6/12			14	5,81

Unter den Proteinen mit geringerer Abundanz im Stamm Tet-Sat4 im Vergleich zum WT zeigte die Aconitase (Aco1p) die deutlichste Veränderung (etwa 5-fach geringer, Spots 1-3). Das Protein wird häufig – wie auch hier – in vielen verschiedenen Laufformen in 2D-Gelen detektiert [107], was vermutlich auf diverse posttranslationale Veränderungen zurückzuführen ist. Die Aconitase trägt ein essentielles 4Fe/S-Cluster und ist im Citratzyklus involviert. Im gleichen Stoffwechselweg spielt die Succinatdehydrogenase Sdh1p (Spot 4, etwa 4-fach geringer) eine Rolle. Ähnlich stark reduziert sich die Abundanz der Isocitrat-Lyase Icl2p, welche am 2-Methylcitratzyklus beteiligt ist [130]. Auch das Proteinlevel der Hemoaconitase Lys4p (Spot 7), die einen essentiellen Schritt der Lysinbiosynthese katalysiert [131], ist signifikant reduziert. Für die beiden Proteine Pil1p (Spot 14) und Lsp1p (Spot 13 und 16) konnte hingegen eine höhere Abundanz in den Mitochondrien von Tet-Sat4 gezeigt werden. Beide Proteine spielen bei der Hitzeschockantwort eine Rolle [132].

Besonders interessant erschienen jedoch die Proteine, welche in mehreren Spots mit entgegengesetzten Intensitätsveränderungen in Tet-Sat4 und dem WT nachgewiesen wurden: Lat1p (Spot 9 und 19), Kgd2p (Spot 6, 11 und 12) und Gcv3p (Spot 8 und 15). Lat1p, die E2-Untereinheit der PDH, und Kgd2p, eine Untereinheit der KGDH, sind beide an der katalytischen Umsetzung im Citratzyklus beteiligt [133]. Die Proteinspots, welche im Tet-Sat4-Gel eine höhere Intensität aufwiesen (10 bzw. 11 und 12), waren sowohl bei Lat1p als auch Kgd2p horizontal zu einem eher sauren pH-Wert verschoben. In Spot 10 wurden neben Lat1p auch Ald4p und Fcj1p identifiziert (Tab. 3). Die MS-Daten legen nahe, dass es sich nicht um Kontaminationen handelt, sondern die Proteine in diesem 2D-Spot comigrieren und damit möglicherweise mit der Quantifizierung interferieren. Trotzdem kann aufgrund der nachfolgende Befunde (Abschnitt 3.3.5) davon ausgegangen werden, dass die stärkere Abundanz von Spot 10 einer erhöhten Proteinkonzentration von Lat1p zuzuschreiben ist. Im Fall von Gcv3p konnte eine Verschiebung der Spots in vertikaler Richtung verzeichnet werden, wobei der Spot mit geringerer Intensität (Abb. 25B, Spot 8) ein höheres Molekulargewicht als der Spot mit höherer Abundanz (Spot 15) besitzt (siehe auch Abschnitt 3.3.5). Gcv3p ist am Abbau von Glycin beteiligt [134] und wird für die Proteinlipoylierung benötigt [135].

Durch weitere Analysen sollte untersucht werden, wodurch sich die – offensichtlich durch Überexpression von Sat4p beeinflussten – Protein-Isoformen von Lat1p, Kgd2p und Gcv3p unterscheiden. Bei bioinformatischen Recherchen fiel auf, dass alle drei Proteine eine Besonderheit gemein haben: Sie tragen Liponsäure als prosthetische Gruppe [135]. Durch detaillierte massenspektrometrische Untersuchungen sollte dieser Fakt experimentell näher analysiert werden.

3.3.5 Analysen zur Lipoylierung von Lat1p, Kgd2p und Gcv3p

Für die detaillierte massenspektrometrische Analyse wurden die Proteinspots von Lat1p, Kgd2p und Gcv3p (detailliert dargestellt in Abb. 26A, I-III) aus dem 2D-Gel ausgeschnitten, mit Trypsin (Lat1p und Kgd2p) bzw. Chymotrypsin (Gcv3p) verdaut und die erhaltenen Peptide mittels nanoLC-MS/MS analysiert (Abb. 26B-D).

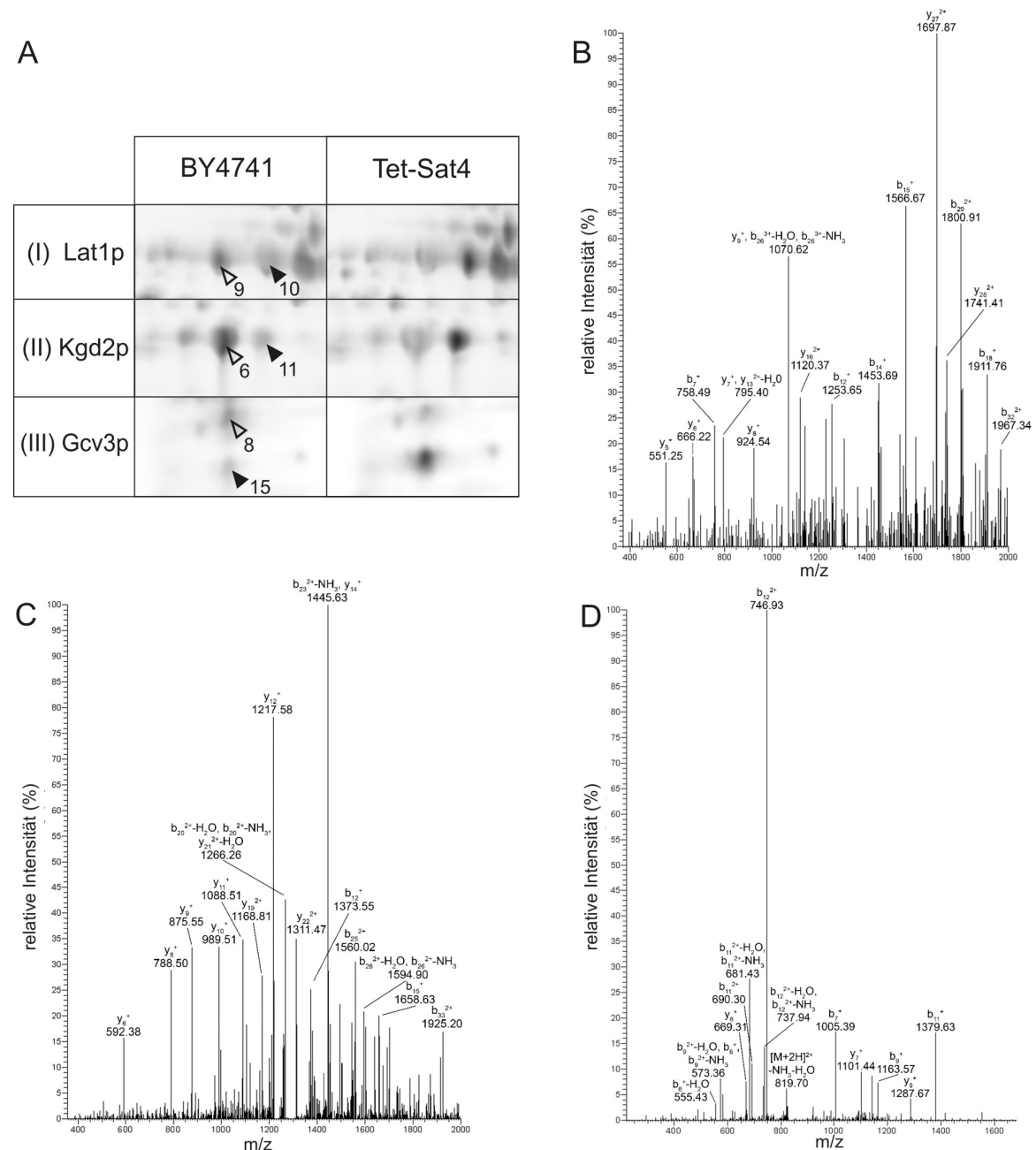


Abb. 26 MS/MS-Analyse der Lipoylierung der Proteine Lat1p, Kgd2p und Gcv3p.

Die in Abb. 21 markierten Bereiche I-III der 2D-Gele des WT (BY4741) und des Stammes Tet-Sat4 sind in **(A)** vergrößert dargestellt. Gefüllte Pfeile kennzeichnen die nicht-lipoylierte, ungefüllte Pfeile die lipoylierte Form des jeweiligen Proteins. **(B)**, **(C)** und **(D)** zeigen die MS/MS-Spektren der Peptide, welche zur Bestimmung der Lipoylierungsstelle genutzt wurden. Das dreifach geladene Peptid mit m/z 1384.299 von Lat1p **(B)** und m/z 1332.003 von Kgd2p **(C)** sowie das zweifach geladene Peptid mit m/z 837.392 von Gcv3p **(D)** wurden analysiert.

Im WT kann Lat1p und Kgd2p überwiegend in den Spots im eher sauren Bereich detektiert werden (Abb. 26A, I+II, ungefüllte Pfeile). Nur ein geringer Teil der Proteine ist im Spot mit basischerem pI nachzuweisen (Abb. 26A, I+II, gefüllte Pfeile). Im Stamm Tet-Sat4 kommt es hingegen zu einer inversen Verteilung der Intensitäten zwischen diesen Spots. Für Gcv3p konnte zwar keine horizontale Verschiebung beobachtet werden, dafür aber eine Intensitätsverschiebung in Richtung des Proteinspots von geringerem Molekulargewicht (Abb. 26A, III).

Diese Veränderung des Migrationsverhaltens der Proteine könnte möglicherweise durch die Modifizierung mit Liponsäure (Lipoylierung) erklärt werden. Diese prosthetische Gruppe wird über einen Lysinrest gebunden. Entsprechend würde ein Verlust der Lipoylierung zu der zusätzlichen positiven Ladung des Lysins und damit einem veränderten pI führen. Interessanterweise fehlten bei der Zuordnung der Peaks von Spot 6, 8 und 9 (Abb. 26A, ungefüllte Pfeile) in der MASCOT-Suche trotz einer sehr hohen Sequenzabdeckung genau die Peptide, die die putativen Lipoylierungsstellen beinhalten (vgl. Abb. A3-A5 im Anhang). Es konnten jedoch in den MS-Spektren dieser Spots nicht-zugeordnete Peaks gefunden werden, die – ausgehend von den fehlenden Peptiden – durch eine Massenzunahme von 304,092 Da erklärt werden können. Diese Masse entspricht exakt der von Liponsäure, welche zusätzlich aufgrund der Probenvorbereitung durch Carbamidomethylierung modifiziert ist. Weder in Spot 10, 11 noch 15 (Abb. 26A, gefüllte Pfeile) konnten derartige Peaks gefunden werden, was ein Fehlen der Lipoylierung an diesen Protein-Isoformen nahelegt.

Eine eindeutige Identifikation der Modifizierungsstellen wurde anhand entsprechender Fragmentationenanalysen durchgeführt. Für Lat1p konnten zwei putative lipoylierte Peptide (AS 57-90 bzw. AS 58-90) detektiert werden (vgl. digitaler Anhang, Tab. DA3). Beide Peptide entstehen durch einen fehlenden Trypsinverdau an Lys75, was ein Hinweis auf die Modifikation dieses AS-Restes sein kann. In Spot 10 hingegen konnten die Peptide, welche durch den Verdau an Lys75 entstehen, gefunden werden (vgl. digitaler Anhang Tab. DA2). Die Lipoylierung von Lat1p (in Spot 9) konnte durch eine Fragmentationenanalyse des dreifach geladenen Peptides mit m/z 1384.299 (Abb. 26B) bestätigt werden. Die Analyse ergab die Peptidsequenz ⁵⁷KEGDQLSPGEVIAEIETD**K**AQMDFEFQEDGYLAK⁹⁰, welche an Met78 oxidiert und an Lys75 mit Liponsäure modifiziert ist. Anhand der Daten konnte die Lipoylierung von Lat1p an Position Lys75, welches in der putativen Lipoyl-Bindedomäne (AS 35-109; [136]) liegt, erstmals experimentell gezeigt werden.

Im Kgd2p-Spot 6 wurde ein potentiell lipoyliertes Peptid (AS 96-129; siehe digitaler Anhang, Tab. DA3) mit fehlendem Trypsinverdau an Lys102 und Lys114 gefunden. Zusätzlich konnte ein nicht-modifiziertes Peptid (AS 96-102) detektiert werden, was eher

für die Liponsäure-Modifikation an Lys114 spricht. In Spot 11 hingegen wurden ausschließlich nicht-modifizierte Peptide der potentiellen Lipoyl-Bindedomäne (AS 74-147; [137]) gefunden (siehe digitaler Anhang Tab. DA2). Anhand der Analyse des MS/MS Spektrums des dreifach geladenen Peptids mit m/z 1332.003 (Abb. 26C) konnte die Lipoylierung eindeutig Lys114 der Sequenz $^{96}\text{NVGDFIKEDELLATIETD}\underline{\text{K}}\text{IDIEVNSPVSGTVTK}^{129}$ zugeordnet werden.

Gcv3p, das dritte lipoylierte Protein in den Mitochondrien, wurde in Spot 8 und 15 identifiziert. Beide Proteinspots wurden mit Chymotrypsin anstelle des sonst üblicherweise verwendeten Trypsins behandelt, da die Gcv3p-Sequenz lange Abschnitte ohne Trypsin-Schnittstellen aufweist. In Spot 8 wurden drei putativ lipoylierte Peptide gefunden (AS 96-108 bzw. 80-108; digitaler Anhang Tab. DA3). Die Lipoylierung von Gcv3p wurde durch Fragmentationenanalyse des zweifach geladenen Peptids mit m/z 837.392 bestätigt (Abb. 26D). Die Analyse ergab die Sequenz $^{96}\text{GSIESV}\underline{\text{K}}\text{SASEIY}^{108}$ mit entsprechender Liponsäure-Modifikation an Lys102, welches in der putativen Lipoyl-Bindedomäne von Gcv3p (AS 99-113; [134]) liegt. Eine Besonderheit von Gcv3p ist, dass die Modifikation nicht – wie bei Lat1p und Kgd2p – eine horizontale, sondern eine vertikale Spotverschiebung zur Folge hatte. Eine mögliche Erklärung könnte der sehr niedrige pI -Wert von Gcv3p und damit verbunden ein ungewöhnliches Migrationsverhalten der verschiedenen Isoformen von Gcv3p in 2D-Gelen sein. Dieses könnte beispielsweise durch eine verminderte SDS-Bindung verursacht werden [138].

Anhand der durchgeführten Analysen konnten die Lipoylierungsstellen von Lat1p, Kgd2p und Gcv3p identifiziert werden. Die Intensität der Spots, welche die jeweilige lipoylierte Proteinform repräsentierten, war im Stamm Tet-Sat4 stark reduziert. Die Ergebnisse legen nahe, dass eine Überexpression von Sat4p mit einer Delipoylierung aller drei mt Proteine mit dieser prosthetischen Gruppe einhergeht.

3.3.6 Analyse der „steady-state“-Konzentration von Aco1p

Zur Verifizierung der 2D-Analyse sollte beispielhaft die stark verminderte Abundanz der Aconitase nach Separation in einer eindimensionalen Elektrophorese und die Verwendung eines Aco1p-Antikörpers bestätigt werden. Dafür wurden Mitochondrien des WT (BY4741) sowie der Stämme Δsat4 und Tet-Sat4 enzymatisch präpariert, Aliquots in einer 10 %igen SDS-PAGE separiert und die Signale nach Detektion unter Verwendung der „ImageQuantTL“ - Software quantifiziert (Abb. 27).

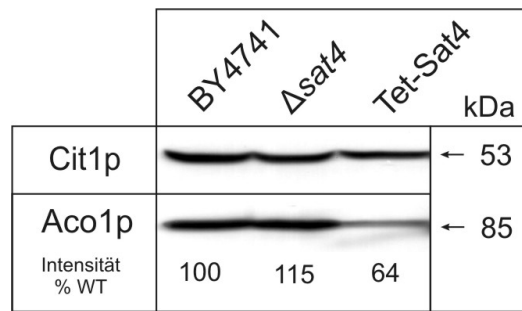


Abb. 27 „Steady-state“ - Konzentration von Aco1p in Abhängigkeit von SAT4.

Mitochondrien der angegebenen Stämme wurden nach Kultivierung auf YPE enzymatisch präpariert und jeweils 40 µg Protein in einer 10 %igen SDS-PAGE separiert. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion mit Aco1p- und Cit1p-Antikörpern. Die Quantifizierung der Signalintensitäten wurde mit Hilfe der „Image Quant TL“-Software durchgeführt. Dabei wurden die Aco1p-Signale auf Cit1p (Kontrolle) normalisiert und die Werte anschließend prozentual im Vergleich zum WT (BY4741, 100 %) berechnet.

Die Detektion der Citratsynthase (Cit1p) diente als Referenzkontrolle und wurde zur Normalisierung der Signale verwendet. Das Cit1p-Signal weist in allen Spuren eine ähnliche Intensität auf (Abb. 27, obere Reihe). Das Signal der Aconitase hingegen scheint offensichtlich im Stamm Tet-Sat4 deutlich geringer als im WT (BY4741) bzw. der Deletionsmutante zu sein. Dies kann durch die Quantifizierung densidometrischer Daten („Image Quant TL“-Software) bestätigt werden. Demnach ist das Aco1p-Signal um etwa 36 % im Vergleich zum WT reduziert. In der Deletionsmutante $\Delta sat4$ kann hingegen sogar ein leichter Anstieg der Signalintensität um 15 % verzeichnet werden. Somit scheint auch der Verlust der durch Sat4p katalysierten Phosphorylierung einen – wenn auch nicht so deutlichen – Effekt auf die „steady-state“-Konzentration der Aconitase zu haben.

Die Ergebnisse bestätigen die verminderte Konzentration von Aco1p bei Überexpression von Sat4p. Die Werte sind allerdings nicht so stark vermindert wie die in der 2D-Analyse ermittelten (auf etwa 20 %; siehe 3.3.4). Möglicherweise spielen hierbei die unterschiedliche Probenbehandlung bzw. die Verteilung des Signals in verschiedene Spots in der 2D-PAGE eine Rolle.

3.3.7 Aktivitätsmessungen mit Enzymkomplexe

Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Korrelationen zwischen den Veränderungen auf Proteomebene (siehe 3.3.4) und den entsprechenden Enzymaktivitäten bestehen. Für die Messung wurden hochreine Mitochondrien des WT sowie der Stämme $\Delta sat4$ und Tet-Sat4 verwendet. Die Aktivität der PDH (Lat1p als Untereinheit), der KGDH (Kgd2p als Untereinheit) sowie der Aconitase (Aco1p) wurde in photometrischen Assays (siehe 2.4.17) gemessen (Abb. 28).

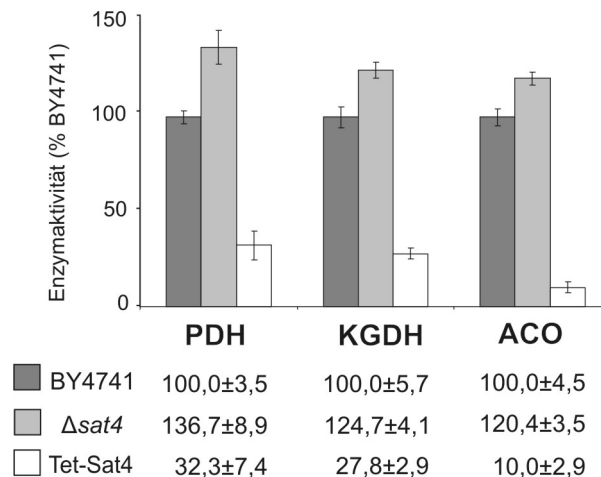


Abb. 28 Aktivitäten mit Enzyme in Abhängigkeit von SAT4.

Die Aktivität der PDH, KGDH sowie der Aconitase (ACO) wurden in hochreinen Mitochondrien des WT (BY4741, dunkelgrau), von $\Delta sat4$ (hellgrau) und Tet-Sat4 (weiss) bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte ($p < 0,05$, \pm Standardabweichung) stammen von drei unabhängigen, jeweils in Triplikaten durchgeführten, Messungen. Die Aktivitäten im WT wurden jeweils 100 % gesetzt.

Im Vergleich zum WT (BY4741) sind sowohl im Deletionsstamm als auch im Stamm Tet-Sat4 signifikante Änderungen aller drei gemessenen Enzymaktivitäten zu verzeichnen. Dabei sinkt die Aktivität der PDH bzw. KGDH bei Überexpression von Sat4p (Tet-Sat4) um etwa 70 %, was durch den beobachteten Verlust der als Cofaktor benötigten Liponsäure (vgl. 3.3.5) erklärt werden könnte. Die Aktivität der Aconitase (ACO; Abb. 28) sinkt sogar um 90 %. Dies legt nahe, dass die Überexpression von Sat4p nicht nur zu einer verminderten Aco1p-Konzentration führt, sondern die Aktivität offensichtlich sogar in größerem Ausmaß beeinflusst wird. Überraschenderweise konnte in $\Delta sat4$ für alle drei Enzyme eine um 20-37 % erhöhte Aktivität im Vergleich zum WT gemessen werden (Abb. 28).

Dieses inverse Verhalten in Deletions- und Überexpressionsmutante deutet auf die mögliche regulatorische Funktion der Kinase Sat4p hin. Die katalysierte Proteinphosphorylierung könnte direkt oder indirekt die Enzymkomplexe bzw. deren Aktivität beeinflussen.

4 Diskussion

Im Gegensatz zur Phosphorylierung von Proteinen anderer zellulärer Kompartimente ist über diese Modifikation in den Mitochondrien wenig bekannt. Erst in den letzten Jahren rückte die mt Proteinphosphorylierung in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses und sensitive Techniken erlaubten eine umfangreiche Kartierung von mt Phosphoproteinen in verschiedenen Eukaryoten. Während in Säugerzellen bereits mehrere Enzym-Target-Korrelationen sowie die physiologische Bedeutung einiger mt Phosphorylierungen aufgeklärt werden konnten, existierten in der Hefe *S. cerevisiae* zu Beginn dieser Arbeit nahezu keine Erkenntnisse bezüglich der Rolle dieser Modifikation sowie den dabei beteiligten Enzymen im Mitochondrium.

Vor diesem Hintergrund lag der Fokus dieser Arbeit auf der Identifikation mt Enzym-Target-Korrelationen in *S. cerevisiae*. Basierend auf bioinformatischen Analysen wurden putative Kandidaten mt PKasen bzw. PPasen ausgewählt. Da die biochemische Analyse von regulatorisch wirksamen Enzymen durch die zumeist transiente Interaktion von Enzym und Target erschwert wird, wurden in den Studien revers-genetische Ansätze genutzt. Zunächst stand die Analyse des mt Proteoms der PKase- bzw. PPase-Deletionsstämme im Fokus, um Hinweise auf mögliche Funktionen oder Targetproteine der regulatorischen Proteine zu erhalten. Im weiteren Verlauf wurde beispielhaft für die Kinase Sat4p eine inverse Herangehensweise durch die Verwendung einer Überexpressionsmutante genutzt.

4.1 Analysen des mt Proteoms von *S. cerevisiae*

Zur Analyse komplexer Proteome eignet sich insbesondere die 2D-IEF/SDS-Gelelektrophorese, welche zu Beginn der Arbeit zur Separation des mt Proteoms von *S. cerevisiae* etabliert und optimiert wurde. Dazu wurden in Vorversuchen verschiedene technische Parameter der IEF wie beispielsweise die Verwendung des *Destreak*-Reagenzes oder die Applikationsmethode der Probe variiert. Da Mitochondrien insbesondere bei der Metabolisierung verschiedener C-Quellen eine zentrale Rolle spielen [29], wurden des Weiteren für die Kultivierung der WT-Zellen verschiedene Kohlenstoffquellen getestet. Das 2D-Gel hochreiner mt Proteine nach Kultivierung in YPE zeigte dabei die größte Anzahl distinkter Spots (~500) nach der Separation, weshalb die Deletionsstämme für die initialen DIGE-Analysen in diesem Medium kultiviert wurden. Die identifizierte Spotzahl liegt im Bereich vergleichbarer Studien, z.B. von Ohlmeier *et al.* [107], die nach Kultivierung unter respiratorischen Bedingungen und der Separation des mt Proteoms in ihrer 2D-PAGE 459 Spots durch Silberfärbung detektierten.

Für die Visualisierung der Spots im Gel wurde in den Experimenten eine Fluoreszenzmarkierung der Proteine vor der Separation (DIGE) gewählt. Die Methode zeichnet sich vor allem durch eine sehr sensitive Detektion sowie die Quantifizierbarkeit der Spots über einen weiten dynamischen Bereich aus. Hinweise auf eine beeinflusste Proteinphosphorylierung in den Mutantenstämmen liefern Unterschiede im 2D-Spotmuster aufgrund des meist veränderten Migrationsverhalten des modifizierten Proteins in dem 2D-Gel [74]. Obgleich es sich um einen indirekten Nachweis der Phosphorylierung bzw. Modifikation handelt, wurde in den initialen Studien bewusst auf eine phosphospezifische Markierung verzichtet. Zum einen stand primär nicht die Identifizierung von Phosphoproteinen, sondern von Enzym-Target-Korrelationen im Fokus der Arbeit. Zum anderen weisen die verfügbaren (nicht-radioaktiven) Systeme zum phosphospezifischen Nachweis im Gel häufig Probleme hinsichtlich Sensitivität und Spezifität auf. Eine direkte Detektion der Phosphoproteine kann beispielsweise durch die Färbung der 2D-Gele mit einem phosphospezifischen Fluoreszenzfarbstoff (*Pro-Q Diamond*) erfolgen, wie es im Fall von Pda1p erfolgreich angewandt werden konnte (vgl. Abb. 12). Es fiel jedoch auf, dass mit Ausnahme dieses Proteins kaum weitere spezifische Signale anderer mit Phosphoproteine detektiert wurden. Neben den begrenzten Möglichkeiten der Quantifizierbarkeit der Phospho-Spots weist die Färbelösung eine geringe Stabilität auf und färbt auch abundante nicht-phosphorylierte Proteine [71]. Alternativ wurde eine Verwendung von Antikörpern, welche gegen phosphorylierte AS gerichtet sind, zum Nachweis von Phosphoproteinen in Western Blot-Analysen in Betracht gezogen (Daten nicht gezeigt). Dieses Vorgehen erwies sich aber aufgrund der geringen Spezifität insbesondere der P-Ser- und P-Thr-Antikörper [4,11,72] als wenig geeignet für proteomweite Untersuchungen.

Die komparativen DIGE-Analysen resultierten insgesamt in der MS-Identifikation von 12 Proteinspots, welche sich in einem oder mehreren PKase-/PPase-Deletionsstämmen mindestens 2-fach und signifikant in ihrer Intensität im Vergleich zum WT unterschieden. Wie im Ergebnisteil (Abschnitt 3.1.3) erläutert, handelt es sich bei der Mehrzahl der Spotänderungen vermutlich um pleiotrope oder unspezifische Effekte, da eine ähnliche Tendenz in fast allen Deletionsstämmen ersichtlich war. Des Weiteren führte eine zu große Varianz in den Duplikaten in vielen Fällen zu nicht-signifikanten Werten. In weiterführenden Untersuchungen wäre die Analyse einer größeren Anzahl an Replikaten ratsam, um zuverlässigere Werte generieren zu können.

Obwohl für die ausgewählten PKasen/PPasen eine mt Lokalisierung nachgewiesen wurde bzw. sehr wahrscheinlich ist, konnten unter den gewählten Bedingungen nur in vier der zehn Deletionsstämme spezifische Änderungen gezeigt werden. Da die Aktivität bzw. physiologische Bedeutung regulatorisch wirksamer Proteine oft sehr abhängig vom Zustand

der Zelle ist [7], könnte der Einsatz alternativer Kultivierungsbedingungen für die Analyse dieser PKase- bzw. PPase-Deletionsstämme zweckmäßig sein. Wie bereits erwähnt, wäre die Verwendung verschiedener C-Quellen im Medium eine Variationsmöglichkeit. Neben der Regulation metabolischer Stoffwechselwege sind Phosphorylierungsnetzwerke auch häufig bei der Adaptation der Zelle und Organellen an verschiedenen Stressbedingungen beteiligt [39,139]. Eine Analyse des mt Proteoms z.B. nach einem Hitzeschock oder der Exposition exogenen oxidativen Stresses wäre deshalb ebenfalls eine Alternative und könnte Hinweise zur Funktion der PKasen und PPasen liefern.

Die prinzipielle Eignung der durchgeführten 2D-DIGE-Analysen konnte jedoch anhand der spezifischen Änderungen von Pda1p in zwei PKase- und zwei PPase-Deletionsstämmen gezeigt werden. Nachfolgende Analysen belegten, dass Pda1p das Target dieser vier regulatorischen Proteine ist. Im exemplarisch durchgeführten inversen Ansatz – der Überexpression von Sat4p – wurden ebenfalls spezifische Änderungen im mt Proteom in der 2D-DIGE nachgewiesen. Die Analysen zur Phosphorylierung von Pda1p bzw. zur Regulation des PDH-Komplexes sowie die Rolle von Sat4p in den Mitochondrien sind im Weiteren Gegenstand der Diskussion.

4.2 Die Regulation des PDH-Komplexes in *S. cerevisiae*

Der eukaryotische PDH-Komplex katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und stellt damit die Verbindung zwischen Glykolyse und Citratzyklus her. Aufgrund der zentralen Rolle im Metabolismus sowie der Irreversibilität der PDH-Reaktion ist eine ausgeprägte Regulation an diesem Schritt erforderlich. Neben der allosterischen Produkthemmung [140,141] erfolgt die Regulation hauptsächlich durch Phosphorylierung an der E1 α -Untereinheit [142,143]. In humanen Zellen wird der Phosphorylierungszustand durch die koordinierte Aktion von vier Kinasen (PDK1-4) und zwei Phosphatasen (PDP1 und 2) reguliert [47]. Die Aktivität sowie Expression dieser regulatorischen Enzyme wird wiederum von einer Vielzahl von Faktoren – etwa der intramitochondrialen Konzentration von Cofaktoren und Substraten bzw. Produkten der PDH-Reaktion – beeinflusst [143-146]. Die Vielschichtigkeit der aktivitätsmodulierenden Faktoren weist auf die große Bedeutung und Komplexität des Regulationsnetzwerkes hin. Verdeutlicht wird dies auch durch die schwerwiegenden Krankheitsbilder, welche sich nicht nur bei Mutationen der strukturellen PDH-Komponenten [147,148] sondern auch aufgrund funktioneller Störungen der PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen [149,150] manifestieren.

Im Gegensatz zu Säugerzellen konnte der *in vivo* vorliegende Regulationsmechanismus sowie die beteiligten Enzyme in der Hefe *S. cerevisiae* bisher nicht charakterisiert werden. In

eigenen Vorarbeiten wurde erstmals für die Kinase Yil042cp (Pkp1p) und die Phosphatase Yor090cp (Ppp1p) eine Rolle bei der Phosphorylierung der E1 α -Untereinheit (Pda1p) postuliert [63]. Diese Verknüpfung zwischen den beiden regulatorischen Proteinen und dem Target Pda1p wird auch durch die initialen DIGE-Experimente in vorliegender Arbeit gestützt. Ähnliche Effekte auf den identifizierten Pda1p-Phosphospot wie in $\Delta pkp1$ bzw. $\Delta ppp1$ wurden auch in zwei weiteren Deletionsstämmen beobachtet. Die entsprechenden Proteine wurden als putative regulatorische PDH-Enzyme Pkp2p (Ygl059wp) bzw. Ppp2p (Ycr079wp) benannt. Der in *S. cerevisiae* vorliegende Regulationsmechanismus sowie die Beteiligung der vier identifizierten regulatorischen Enzyme wurden detailliert untersucht und sollen im Folgenden diskutiert werden.

Sind die putativen PDH-Kinasen und -Phosphatasen mt lokalisierte Proteine?

Der Nachweis der Phosphorylierung und Regulation des PDH-Komplexes gelang *in vitro* in isolierten Mitochondrien von *S. cerevisiae* [44]. Eine mt Lokalisation der putativen regulatorischen Proteine stellt somit eine essentielle Voraussetzung für eine direkte Beteiligung an der *in vivo* Regulation des in der Matrix lokalisierten PDH-Komplexes dar.

Für die putativen PDH-Kinasen (Pkp1p und Pkp2p) sowie PDH-Phosphatasen (Ppp1p und Ppp2p) existieren konforme *in silico* Vorhersagen mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit für den Import in das mt Kompartiment (MITOPROT [109]; PSORT [126]). Weiterhin konnten Pkp1p, Pkp2p und Ppp1p in massenspektrometrischen Analysen hochreiner Mitochondrien identifiziert [102] und GFP-getaggte Varianten der beiden Kinasen durch Fluoreszenzmikroskopie im Mitochondrium nachgewiesen werden [151].

In der vorliegenden Arbeit konnte die mt Lokalisation aller vier putativen PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen experimentell unter Nutzung Epitop-getaggtter Varianten und der Präparation hochreiner Mitochondrien verifiziert werden. Ergänzend wurde durch eine Proteinase K-Behandlung die intramitochondriale Lokalisation von Ppp2p untersucht, da dieses Protein in einer Publikation [120] im mt IMS lokalisiert wurde. Obgleich nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass ein minimaler Anteil des Proteins diese Lokalisation aufweist, spricht die nachgewiesene Proteinase K-Resistenz des Proteins in Mitoplasten dagegen.

Aufgrund der *in silico*-Voraussagen sowie der experimentellen Belege kann davon ausgegangen werden, dass die putativen PDH-Kinasen (Pkp1p und Pkp2p) und PDH-Phosphatasen (Ppp1p und Ppp2p) mt lokalisiert sind. Die Tatsache, dass alle vier Proteine über eine putative N-terminale mt Importsequenz verfügen (MITOPROT; [109]) und keine Transmembrandomäne aufweisen (SGD; [100]), legen nahe, dass es sich um mt Matrixproteine handelt.

Wird der PDH-Komplex von *S. cerevisiae* in vivo durch Phosphorylierung reguliert?

Die Regulation des PDH-Komplexes durch Phosphorylierung konnte bereits in einer Reihe eukaryotischer Zellen von Säugern, Vögeln, Pflanzen sowie *Neurospora crassa* nachgewiesen werden [143,152,153]. Bei allen bisher charakterisierten Organismen führt eine Phosphorylierung der E1-Komponente zur Inaktivierung des Komplexes, welcher durch Dephosphorylierung reaktiviert werden kann. In *S. cerevisiae* konnte zumindest *in vitro* durch die Verwendung heterologer PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen diese Aktivitätsregulation des PDH-Komplexes gezeigt werden [44,121].

In vorliegender Arbeit gelang es, zwei PDH-Kinasen (Pkp1p und Pkp2p) sowie zwei PDH-Phosphatasen (Ppp1p und Ppp2p) zu charakterisieren, welche *in vivo* an der Regulation des PDH-Komplexes der Hefe beteiligt sind. Die Deletion bereits einer der Kinasen führt zu einem gleichermaßen starken Verlust der Phosphorylierung der E1 α -Untereinheit Pda1p, welche insbesondere im Stamm $\Delta p k p 2$ mit einem Anstieg der PDH-Aktivität verbunden ist. *Vice versa* führt die Deletion von Ppp1p oder Ppp2p zur Hyperphosphorylierung von Pda1p, welche durch eine verminderte PDH-Aktivität begleitet wird. Die mit dem Phosphorylierungszustand von Pda1p einhergehenden PDH-Aktivitätsänderungen sprechen dafür, dass in der Hefe *in vivo* ein ähnlicher Regulationsmechanismus der Aktivität des PDH-Komplexes vorliegt wie in höheren Eukaryoten.

Bei Säugern findet die Regulation durch Modifikation an den drei Phosphorylierungsstellen Ser264 (P1), Ser271 (P2) und Ser203 (P3) der E1 α -Untereinheit statt [43,45]. Die Phosphorylierung einer der drei Serinreste bzw. eine Kombination mehrerer Phosphorylierungen resultieren in einer differenzierten PDH-Inaktivierung [45,145]. Dabei führt die Modifikation von Ser254 (P1) bereits zu einer Inaktivierung von etwa 90 %, weshalb P1 als Haupt-Phosphorylierungsstelle bezeichnet wird [154].

Das Hefeprotein Pda1p besitzt eine starke Ähnlichkeit zur humanen E1 α -Untereinheit (73 % Homologie und 56 % Identität; vgl. Anhang Abb. A7). Jedoch ist von den drei regulatorisch wirksamen Serinresten nur der zum Ser254 äquivalente (Ser313 in Pda1p) konserviert. In den 2D-Experimenten konnte mittels MS im Pda1p-Phosphospot (Spot 1; vgl. 3.2.4) ausschließlich eine Phosphorylierung dieses Ser313 nachgewiesen werden. Die Intensitätsänderungen des Spots in den Deletionsstämmen der putativen PDH-Kinasen sowie -Phosphatasen legen nahe, dass dies die Target-AS aller vier regulatorischen Enzyme ist. Wie bereits im Ergebnisabschnitt (3.2.4) geschildert, gestaltete sich die Quantifizierung des nicht-phosphorylierten Pda1p-Spots schwierig, da er von dem abundanten Cor1p überlagert wird und dies mit der Quantifizierung interferiert. Trotzdem konnten zumindest tendenziell die im Vergleich zum Pda1p-Phosphospot entgegengesetzten Intensitätsänderungen in den Deletionsstämmen verzeichnet werden.

Eine Phosphorylierung des Ser313 von Pda1p wurde bereits in einer Vielzahl verschiedener Studien nachgewiesen [44,55-58,115-117,121]. Uhlinger *et al.* [121] zeigten *in vitro*, dass die Phosphorylierung dieses Serinrestes von Pda1p durch eine heterologe PDH-Kinase zur vollständigen Inaktivierung des PDH-Komplexes führt. Es ist daher unwahrscheinlich, dass das Hefeprotein mehrere regulatorisch wirksame Phosphorylierungsstellen besitzt. Einige massenspektrometrische Studien identifizierten jedoch neben dem modifizierten Ser313 weitere Phosphorylierungsstellen. Dazu zählen die Phosphorylierung an Ser254 [115], Ser315 [55,117] sowie Tyr309 [55]. Möglicherweise handelte es sich hierbei um artifizielle Phosphorylierungen oder falschpositive MS-Identifikationen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese auch *in vivo* zumindest transient vorliegen. Zwar konnte in den MS-Analysen des abundanten Pda1p-Phosphospots (Spot 1) die Phosphorylierung anderer AS-Reste neben dem Ser313 ausgeschlossen werden. In den 2D-Gelen wurden aber auch zwei kleinere Spots (Abb. 12, Spot 3+4) durch die Phosphofärbung visualisiert, welche entweder unterschiedliche Laufformen des Pda1p-Phosphospots oder aber alternative Pda1p-Varianten repräsentieren könnten. Obgleich die Identifikation durch MS nicht gelang, wird diese Vermutung durch einen Vergleich mit den 2D-Analysen von Ohlmeier *et al.* [60,107] gestützt, in welchen an den analogen Positionen dieser Spots Pda1p identifiziert wurde. Möglicherweise handelt es sich um Pda1p-Isoformen mit unterschiedlichen bzw. multiplen Phosphorylierungen, welche ebenfalls die Aktivität beeinträchtigen könnten. Im humanen System findet die Regulation zwar im Wesentlichen durch die Phosphorylierung der P1 statt, eine Phosphorylierung anderer Serinreste verlangsamt aber – vermutlich aufgrund des zusätzlichen Angebotes an Phosphatresten für die PDH-Phosphatasen – die Reaktivierung des Komplexes [47]. Die Intensitätsänderungen dieser zwei kleineren Spots verhielten sich in den untersuchten *PKP*- bzw. *PPP*-Deletionsstämmen analog zu dem abundanten Pda1p-Phosphospot. Sollte es sich tatsächlich um Pda1p-Isoformen mit anderen bzw. zusätzlichen Phosphorylierungen handeln, dann wären diese Phosphorylierungsstellen sehr wahrscheinlich ebenfalls Targets der identifizierten PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen.

In den Analysen dieser Arbeit wurden respiratorische Kultivierungsbedingungen (YPE) gewählt, unter welchen eine hohe Aktivität und damit ein geringer Phosphorylierungsgrad der PDH zu erwarten wäre. Überraschenderweise konnte jedoch im Wildtyp eine vergleichsweise starke Phosphorylierung von Pda1p nachgewiesen werden (Abb. 12). Dies legt nahe, dass der PDH-Komplex *in vivo* in einem intermediären Phosphorylierungszustand vorliegt. Auch in Säugerzellen existiert der Komplex in keinem der untersuchten Gewebe in seinem vollständig aktiven (dephosphorylierten) bzw. inaktiven (phosphorylierten) Zustand [155]. Diese Beobachtungen verdeutlichen die große Relevanz der Regulation des PDH-Komplexes auf Ebene der posttranslationalen Modifikation, welche eine Modulation der

Enzymaktivität ausgehend von diesem intermediären Aktivitätszustand binnen kürzester Zeit ermöglicht.

Sind die regulatorischen Enzyme mit dem PDH-Komplex assoziiert?

Regulatorische Proteine wie Kinasen und Phosphatasen gehen häufig nur temporär eine Assoziation mit ihrem Targetprotein ein. Im Gegensatz dazu konnten beim PDH-Komplex von Säugern sowohl die Kinasen als auch die Phosphatasen als Bestandteil des Komplexes identifiziert werden [31,47,156]. Dabei scheinen die PDH-Kinasen integraler Bestandteil des Komplexes und fest gebunden zu sein, während die PDH-Phosphatasen nur über schwächere Wechselwirkungen mit dem Komplex assoziiert sind [144]. In *S. cerevisiae* gelang der Nachweis der regulatorischen Enzyme am isolierten PDH-Komplex jedoch nicht [41,44,121]. Aus der Literatur ist bekannt, dass der PDH-Komplex sehr salzlabil ist [92], was möglicherweise die fehlende Aufreinigung der PDH-Kinasen bzw. -Phosphatasen mit dem Komplex erklären könnte. Durch die Modifikation der Separationsbedingungen („Niedrigsalzbedingungen“) konnte die native Elektrophorese für die Analyse des PDH-Komplexes optimiert [78] und Hinweise für eine physikalische Interaktion zwischen dem PDH-Komplex und den regulatorischen Enzymen generiert werden ([63] und diese Arbeit).

Bei der Separation in der 2D-BN/SDS-PAGE konnten Pda1p-Signale im hochmolekularen Bereich (BN-Sammelgel) detektiert werden, welche wahrscheinlich die Lage des voll-assemblierten, etwa 8 MDa großen PDH-Komplexes repräsentieren. Die kontinuierlichen Signale über den gesamten Molekulargewichtsbereich sind vermutlich auf eine teilweise Dissoziation des Pda1p von dem Komplex während der Elektrophorese zurückzuführen. Es sind jedoch auch fokale Akkumulationen im geringeren Molekulargewichtsbereich nachweisbar, welche möglicherweise stabilere PDH-Subkomplexe repräsentieren. Diese könnten entweder Degradationen infolge der Präparation bzw. elektrophoretischen Separation oder Assemblierungsstufen des hochmolekularen PDH-Komplexes sein.

Einige in der Literatur beschriebenen Befunde unterstützen die Hypothese der Existenz kleinerer PDH-Komplexe. Milne *et al.* [157] wiesen beispielsweise darauf hin, dass auch bei der *in vitro* Assemblierung des Komplexes aus den Einzelkomponenten die gebildeten Komplexe sehr heterogen und in ihrer Größe variabel sind. Des Weiteren führten Margineantu *et al.* [119] *in vivo* Untersuchungen mit einer GFP-getaggten Variante von Pda1p durch. In ihren Experimenten fanden sie distinkte, stark fluoreszierende Objekte in der mt Matrix, bei welchen es sich um den voll-assemblierten PDH-Komplex handelte. Eine schwächere Färbung wurde auf die Existenz freier E1-Untereinheiten bzw. kleinerer PDH-Subkomplexe zurückgeführt, welche den in der BN-PAGE detektierten entsprechen könnten.

Das Separationsprofil der PDH-Kinasen und -Phosphatasen ähnelt stark dem von Pda1p und deutet damit auf eine physikalische Interaktion mit dem PDH-Komplex hin. Die regulatorischen Enzyme liegen dabei nicht nur am voll-assemblierten Komplex, sondern auch an den putativen kleineren Subkomplexen assoziiert vor. Die Bindung der regulatorischen Enzyme am Hefe-Komplex ist jedoch im Vergleich zu Säugerzellen vermutlich relativ labil. Zwar konnte in dieser Arbeit eine Assoziation mit dem Komplex unter Verwendung der vergleichsweise milden Bedingungen der BN-PAGE gezeigt werden. Wie bereits erwähnt, gelang es jedoch nicht eine PDH-Kinase bzw. -Phosphatase bei der Isolation des Komplexes von *S. cerevisiae* nachzuweisen [41,44]. In Säugerzellen wird insbesondere für die PDH-Kinasen eine ungewöhnlich feste Bindung an den Komplex beschrieben [43,143,158], für welche der extreme C-Terminus der Kinasen eine entscheidende Rolle spielt [159]. Obwohl die PDH-Kinasen von *S. cerevisiae* zu denen von Säugern im N-terminalen und zentralen Abschnitt eine hohe Homologie aufweisen, ist der C-terminale Bereich nicht konserviert (siehe Sequenzvergleich im Anhang Abb. A1). Dieser Fakt sowie die experimentellen Befunde sprechen dafür, dass die Bindung der regulatorischen Enzyme der Hefe auf eine andere Art und Weise erfolgt als in höheren Eukaryoten.

Wie agieren Pkp1p und Pkp2p bei der Phosphorylierung von Pda1p?

In dieser Arbeit wurden in *S. cerevisiae* zwei PDH-Kinasen – Pkp1 und Pkp2 – charakterisiert, welche beide zur Gruppe der atypischen PKasen zählen [20,21] und homolog zu den humanen PDH-Kinasen (PDK1-4) sind (vgl. Abb. A1). Der Verlust von Pkp1p oder Pkp2p führt zu einer identischen Abnahme der Abundanz sowie der phosphospezifischen Färbung des Pda1p-Spots in der 2D-IEF/SDS-PAGE. Die Deletion beider Kinasen ($\Delta p k p 1+2$) zeigt einen additiven Effekt, da die Abundanz dieses Spots sogar noch etwas deutlicher reduziert ist.

Die Ergebnisse sprechen für komplementäre Funktionen von Pkp1p und Pkp2p bei der Phosphorylierung von Pda1p. Im identifizierten Pda1p-Phosphospot wurde ausschließlich eine singuläre Phosphorylierungsstelle an Ser313 nachgewiesen, weshalb ein kumulativer Mechanismus von Kinaseaktivitäten an verschiedenen Phosphorylierungsstellen wie im Säugersystem hier offensichtlich nicht vorliegt. Wie bereits erwähnt existieren in höheren Eukaryoten vier Isoenzyme der PDH-Kinase (PDK1-4), welche über unterschiedliche Affinitäten zu den drei Phosphorylierungsstellen (Ser264 (P1), Ser271 (P2) und Ser203 (P3)) verfügen [46,47]. Es wurde aber gezeigt, dass alle vier Isoenzyme in der Lage sind, die E1-Untereinheit an der Hauptphosphorylierungsstelle P1 (Ser264; entspricht Ser313 in Pda1p)

zu phosphorylieren [45,160]. Dabei besitzen die Kinasen unterschiedliche Substrataffinitäten, was auch für Pkp1p und Pkp2p bei der Phosphorylierung von Pda1p vorstellbar wäre.

Im Falle einer überlappenden Funktion von Pkp1p und Pkp2p bei der Phosphorylierung wäre bei Verlust einer Kinase zu erwarten, dass Pda1p aufgrund der Aktivität der zweiten Kinase noch phosphoryliert wird. In den Analysen führte jedoch das Fehlen bereits einer der Kinasen zu einer starken Verminderung der Pda1p-Phosphorylierung. Möglicherweise ist die gleichzeitige Aktivität beider Kinasen nötig, um die hohe Dephosphorylierungsrate der PDH-Phosphatasen zu kompensieren. Der Energiebedarf für diese Art der Regulation wäre jedoch enorm, weshalb diese Erklärung sehr unrealistisch scheint. Wahrscheinlicher ist ein Mechanismus, bei dem die Interaktion beider Kinasen eine wichtige Rolle für die effiziente Phosphorylierung von Pda1p spielt. Eine physikalische Interaktion von Pkp1p und Pkp2p *in vivo* konnte in dieser Arbeit anhand der Ergebnisse einer Co-Immunopräzipitation sowie der TAP-Methode gezeigt werden. Vorstellbar wäre, dass eine Interaktion der Kinasen nötig ist, um eine Bindung an den Target-Komplex zu ermöglichen. In Säugern werden die PDH-Kinasen durch die Bindung an die Lipoyldomäne der E2-Untereinheit (Lat1p) aktiviert [159], wofür die C-terminale Domäne der Kinasen essentiell ist. Wie bereits erwähnt, fehlt diese Bindedomäne in den Hefeproteinen. Eine Bildung von heteromeren Pkp1p/Pkp2p-Komplexen könnte die Basis für die Interaktion mit dem PDH-Komplex darstellen. Neben dieser Möglichkeit ist auch eine gegenseitige Phosphorylierung und Aktivierung der beiden Kinasen untereinander denkbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Pkp2p ebenso wie Pkp1p eine Kinase von Pda1p ist. Dagegen sprechen jedoch einige strukturelle Aspekte, in welchen sich die Sequenzen von Pkp1p und Pkp2p trotz ihrer hohen Homologie unterscheiden (vgl. Sequenzvergleich Abb. A1). Mt PDH-Kinasen besitzen fünf hochkonservierte Regionen, die vermutlich an der Bildung der katalytischen Domäne beteiligt sind [46]. Während einige hochkonservierte AS-Reste in diesen Subdomänen in Pkp1p vorhanden sind, fehlen diese in der Sequenz von Pkp2p. Dazu zählt beispielsweise das His148 in der Subdomäne I, welches direkt in den katalytischen Phosphattransfer involviert ist [161]. Auch die konservierten Glycin-reichen Abschnitte der Domänen III und V, die an der Bildung der Nukleotidbindetasche beteiligt sind [162], sind in den humanen PDH-Kinasen und Pkp1p perfekt konserviert – aber nicht in Pkp2p. Dementgegen sprechen die *in vitro* gezeigte Kinaseaktivität von Pkp2p [25,151] sowie die Befunde dieser Arbeit für eine katalytisch-aktive Kinase. Möglicherweise deuten die strukturellen Besonderheiten von Pkp2p darauf hin, dass sich der Mechanismus der katalysierten Reaktion sowie des Phosphattransfers zu den anderen PDH-Kinasen unterscheidet.

Wie beeinflussen die PDH-Kinasen die Aktivität und molekulare Organisation des PDH-Komplexes?

Obgleich das Fehlen von Pkp1p oder Pkp2p zu einem gleichstarken Verlust der Phosphorylierung von Pda1p führt, sind die Auswirkungen im Bezug auf die Aktivität des PDH-Komplexes überraschenderweise nicht identisch. Während im Stamm $\Delta p k p 1$ die PDH-Aktivität mit dem WT vergleichbar ist, steigt sie bei Deletion von Pkp2p um etwa 45 %. Eine Doppeldeletion von *PKP1* und *PKP2* führt sogar zu einer Steigerung auf 194 % der Aktivität im Vergleich zum WT. Dies deutet auf einen additiven Effekt des Verlustes beider Kinasen hin. Die unterschiedliche PDH-Aktivität in $\Delta p k p 1$ und $\Delta p k p 2$ legt nahe, dass sich die Kinasen hinsichtlich ihrer Wirkweise unterscheiden.

Die BN-PAGE-Analysen zeigten interessanterweise, dass auch die Auswirkungen der Kinase-Deletionen auf die molekulare Organisation des PDH-Komplexes verschieden sind. Während in $\Delta p k p 1$ die PDH-Aktivität überwiegend von PDH-Subkomplexen geringeren Molekulargewichts ausgeht [63], liegt der Komplex in $\Delta p k p 2$ hauptsächlich im höhermolekularen Bereich vor. Diese Beobachtung könnte eine Erklärung für den Unterschied in der gemessenen PDH-Aktivität sein, da die PDH-Enzymreaktion im vollständig assemblierten Komplex aufgrund eines optimalen „Substrat-Channeling“ [163] wahrscheinlich deutlich effizienter abläuft als in den kleineren Komplexen.

Die in der BN-PAGE detektierten Subkomplexe könnten entweder Assemblierungsvorstufen des hochmolekularen Komplexes darstellen oder durch dessen Destabilisierung entstehen. Bei der in vorliegender Arbeit durchgeführten PDH-Aktivitätsfärbung nach Separation in der CN-PAGE wurden keine aktiven Subkomplexe nachgewiesen. Vermutlich liegt dies in der unterschiedlichen Fähigkeit der zwei nativen Elektrophoresen zum Erhalt labiler Proteinkomplexe begründet. Die CN-PAGE ist die „mildere“ der beiden Methoden und erhält auch physiologische Assemblate, welche über schwache Wechselwirkungen assoziiert sind [164]. Eine Akkumulation von Subkomplexen in der BN-PAGE könnte deshalb ein Hinweis für die *in vivo* Destabilisierung des hochmolekularen Komplexes sein. Es kommt jedoch bei der CN-PAGE auch häufiger zur Proteinaggregation [91], was ebenfalls die ausschließliche PDH-Aktivität in den hochmolekularen Proteinkomplexen/-aggregaten im Vergleich zur BN-PAGE erklären könnte und eher für das Vorliegen der Subkomplexe *in vivo* – möglicherweise als Assemblierungsstufen – sprechen würde.

Für Pkp1p könnte aufgrund der Akkumulation der Subkomplexe im Deletionsstamm eine Rolle bei der Assemblierung und/oder Stabilisierung des PDH-Komplexes postuliert werden [63]. Unterstützt wird dies auch durch den Befund, dass Pkp1p überwiegend in dem Molekulargewichtsbereich der kleineren PDH-Komplexe (~100-500 kDa) präsent ist. Pkp2p liegt hingegen insbesondere im hochmolekularen sowie dem Bereich der größeren

Subkomplexe (bei etwa 500-2000 kDa) vor. In letzterem Bereich akkumuliert Pda1p bei Deletion der Kinase ($\Delta pkp2$) auch etwas stärker als im WT, was ein Hinweis auf eine mögliche Rolle dieser Kinase in den späteren Schritten der Assemblierung des PDH-Komplexes sein kann. Die Effekte in $\Delta pkp2$ sind jedoch im Vergleich zu $\Delta pkp1$ nur sehr schwach ausgeprägt, weshalb Pkp2p höchstens eine untergeordnete Rolle bei der molekularen Organisation des PDH-Komplexes spielt.

Der Einfluss der Kinasen – insbesondere von Pkp1p – auf die molekulare PDH-Komplexorganisation könnte auf eine koordinierte Assemblierungs- und Aktivitätsregulation in *S. cerevisiae* hindeuten. Für Säugerzellen wird ein sogenannter „hand-over-hand“-Mechanismus für die Bewegung der Kinasen über den Komplex postuliert, wobei die Bindung und Dissoziation von dem flexiblen Lipoylarm eine effiziente Phosphorylierung der 20-30 E1-Untereinheiten des Komplexes durch wenige Kinase-Moleküle erlaubt [165]. Wie bereits erwähnt, sind die PDH-Kinasen der Hefe vermutlich nicht über den Lipoylrest am Komplex gebunden, weshalb ein ähnlicher Mechanismus wie in den Säugerzellen unwahrscheinlich ist. Stattdessen könnte in der Hefe eine (zusätzliche) Regulation der PDH-Aktivität auf Ebene der Komplexassemblierung postuliert werden. Möglicherweise existiert ein Pool inaktiver PDH-Subkomplexe, welcher bei Bedarf zur Assemblierung eines funktionellen PDH-Komplexes genutzt werden kann. Hierbei könnten die PDH-Kinasen – besonders Pkp1p – eine Rolle bei der Aktivierung der Subkomplexe oder Stabilisierung des 8 MDa-Komplexes spielen. Die in der nativen PAGE identifizierten kleineren Komplexe könnten somit das Regulations- und Assemblierungsgerüst des hochmolekularen PDH-Komplexes darstellen. Offen bleibt jedoch die Frage, ob es sich tatsächlich um Assemblierungsstufen oder Degradationsprodukte aufgrund einer Destabilisierung des hochmolekularen PDH-Komplexes handelt.

Welchen Einfluss haben die PDH-Phosphatasen Ppp1p und Ppp2p auf den PDH-Komplex?

Im Gegensatz zu den PDH-Kinasen scheinen Ppp1p und Ppp2p keinen Einfluss auf die molekulare Organisation des PDH-Komplexes zu haben. Das Separationsprofil von Pda1p in der BN-PAGE ähnelt in den Stämmen $\Delta ppp1$ [63] und $\Delta ppp2$ dem im WT detektierten. In beiden Deletionsstämmen kann jedoch eine Hyperphosphorylierung von Pda1p gezeigt werden, was eine zumindest partiell redundante Funktion der Phosphatasen zeigt. Die Abundanz des Pda1p-Phosphospots ist dabei im $\Delta ppp1$ -Stamm um 47 % erhöht, während eine Deletion von Ppp2p zu einer 90 % höheren Intensität führt. Dieser unterschiedlich starke Effekt korreliert invers auch mit der gemessenen PDH-Aktivität, welche in $\Delta ppp1$ etwa 50 % reduziert ist, in $\Delta ppp2$ jedoch nur noch etwa 6 % der WT-Aktivität beträgt. Diese

Beobachtung weist vermutlich auf eine geringere Pda1p-Dephosphorylierungsrate durch Ppp1p im Vergleich zu Ppp2p hin.

In Säugerzellen sind ebenfalls zwei PDH-Phosphatasen (PDP1 und PDP2) bekannt, welche sich hinsichtlich ihrer Regulation durch verschiedene Faktoren sowie der Kinetik der katalysierten Dephosphorylierungsreaktion unterscheiden [166]. PDP1 ist in der Lage, den PDH-Komplex bei Bedarf deutlich schneller zu dephosphorylieren und trägt damit die größere Bedeutung für die Reaktivierung [167]. Ein ähnliches Szenario ist für die PDH-Phosphatasen der Hefe denkbar, wobei Ppp2p vermutlich eine bedeutendere Rolle bei der Regulation des Komplexes zukommt als Ppp1p. Dies wird durch die Ergebnisse der Untersuchungen der Doppeldeletionsmutante $\Delta ppp1+2$ unterstützt, in der die Effekte auf den Pda1p-Phosphorylierungszustand sowie die PDH-Aktivität vergleichbar mit der Situation in $\Delta ppp2$ sind und damit kein additiver Effekt vorliegt.

In den Wachstumsanalysen in YPD und YPE wurde für den Deletionsstamm $\Delta ppp2$ eine stärkere Beeinträchtigung des Wachstums verzeichnet als beim Stamm $\Delta pda1$, in welchem kein funktioneller PDH-Komplex gebildet werden kann. Dieser Befund spricht für eine zusätzliche physiologische Rolle von Ppp2p neben der Regulation des PDH-Komplexes. In der Tat wurden für Ppp2p bereits einige andere putative Funktionen in der Literatur beschrieben. So wird der Phosphatase eine Rolle in der Mitophagie bei Langzeitkultivierung [120,168] zugeschrieben. Des Weiteren wurde anhand phänotypischer Analysen eine Sensitivität der Deletionsmutante gegenüber Rapamycin [105] und Koffein [23] gezeigt. Einige dieser phänotypischen Beobachtungen sind wahrscheinlich pleiotrope Effekte der stark beeinträchtigten PDH-Aktivität in $\Delta ppp2$. So wurde beispielsweise eine Rapamycin-Sensitivität auch im $\Delta pda1$ Stamm gezeigt [99]. Einige Befunde sind jedoch offenbar unabhängig von der Regulation des PDH-Komplexes, weshalb Ppp2p vermutlich eine multifunktionale PPase ist. In den DIGE-Proteomanalysen der Deletionsmutante änderte sich neben dem Pda1p-Spot auch die Abundanz des Flavohämoglobins Yhb1p. Für dieses Protein wurden von Albuquerque *et al.* [55] sowohl Serin- (Ser210) als auch Threonin- (Thr22) Phosphorylierungen nachgewiesen, weshalb es ein mögliches Target von Ppp2p darstellt. Es könnte sich jedoch – insbesondere aufgrund der Rolle von Yhb1p in der Stressantwort [169] – auch um einen sekundären Effekt handeln. Die stark verminderte PDH-Aktivität im $\Delta ppp2$ -Stamm führt vermutlich zu Einschränkungen im Metabolismus und nachgeschaltet zur Initiation verschiedener Stressantworten. Im mt Proteom von $\Delta ppp2$ konnten – zumindest unter den gewählten Bedingungen – keine anderen Unterschiede detektiert werden. Weiterführende Analysen unter Verwendung alternativer Kultivierungsbedingungen könnten Aufschluss über mögliche zusätzliche Funktionen bzw. Targetproteine von Ppp2p liefern.

Wie wird der PDH-Komplex der Hefe *in vivo* reguliert?

Die Erkenntnisse der Untersuchungen sollen durch ein Modell der *in vivo* Regulation des PDH-Komplexes in der Hefe und der Rolle der charakterisierten regulatorischen Enzyme zusammengefasst werden (Abb. 29).

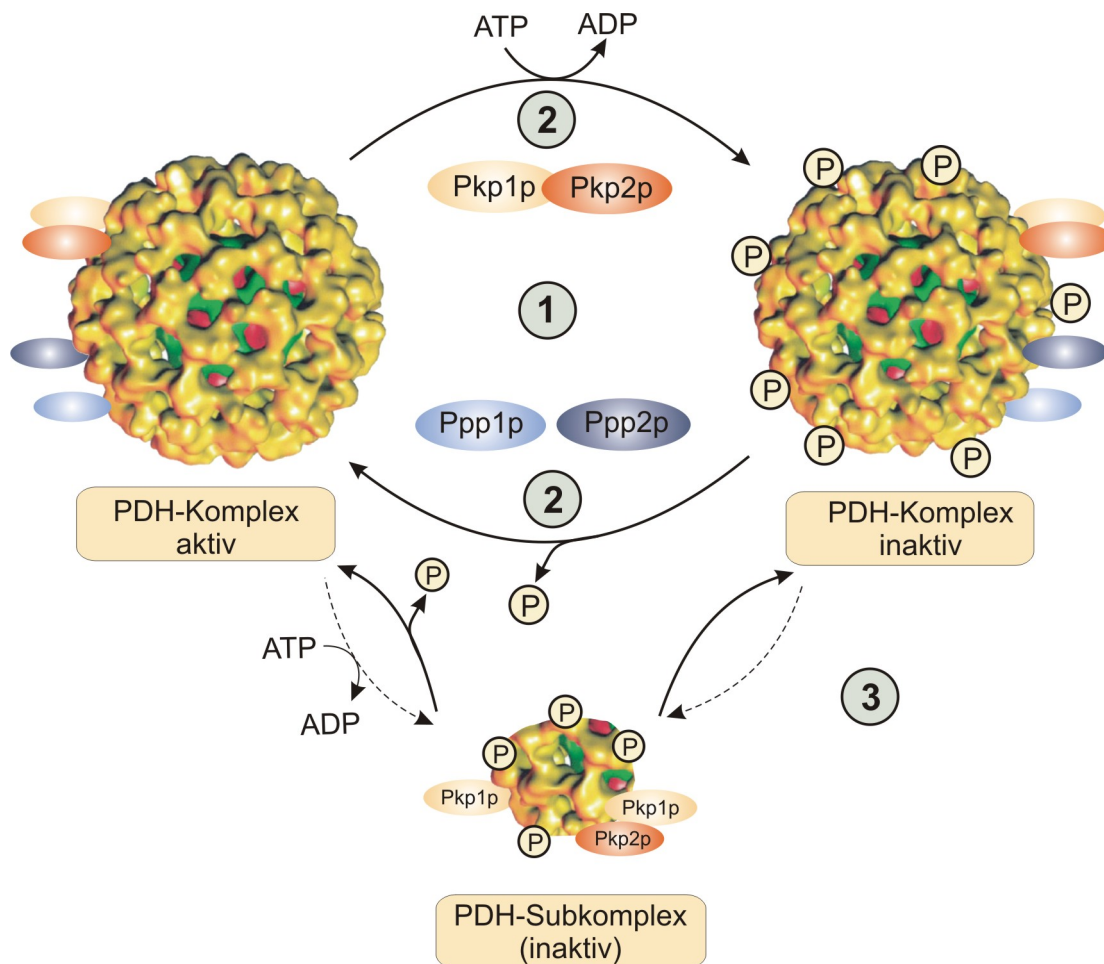


Abb. 29 Modell der Regulation des PDH-Komplexes in *S. cerevisiae*.

Die einzelnen Aspekte (1-3; grau unterlegt) zur Rolle der PDH-Kinasen Pkp1p und Pkp2p sowie der PDH-Phosphatasen Ppp1p und Ppp2p sind im Text erläutert. Die dreidimensionale Rekonstruktion des PDH-Komplexes wurde aus [143] entnommen.

- (1) Die Aktivität des PDH-Komplexes von *S. cerevisiae* wird durch reversible Phosphorylierung des Ser313 der E1 α -Untereinheit Pda1p reguliert. Dabei phosphorylieren die PDH-Kinasen Pkp1p und Pkp2p den Komplex und inaktivieren ihn dadurch. Die Reaktivierung erfolgt durch Dephosphorylierung, welche von Ppp1p und Ppp2p katalysiert wird. Alle vier regulatorischen Proteine liegen über schwache Wechselwirkungen am PDH-Komplex gebunden vor (diese Arbeit und [63]).
- (2) Die Art und Weise der Aktion der PDH-Kinasen unterscheidet sich von jener der PDH-Phosphatasen. Pkp1p und Pkp2p besitzen eine komplementäre Aktivität. Die Bildung von Heteromeren beider Kinasen könnte eine Rolle bei deren

Aktivitätsregulation oder der Bindung an das Target spielen. Ppp1p und Ppp2p zeigen hingegen eine partielle funktionelle Redundanz, wobei Ppp2p eine größere Bedeutung in Bezug auf die Regulation bzw. Phosphorylierung zukommt.

- (3) Für die Regulation der Aktivität könnte des Weiteren die Dynamik der Komplex-Assemblierung eine Rolle spielen, in welche die PDH-Kinasen involviert sind. Die Assemblierung des ~8 MDa großen Komplexes erfolgt möglicherweise aus niedermolekularen PDH-Subkomplexen, welche phosphoryliert und inaktiv vorliegen [63]. Insbesondere die Kinase Pkp1p ist an diesen assoziiert und könnte als regulatorische oder strukturelle Komponente eine Rolle bei der kontrollierten Assemblierung und/oder Stabilisierung des hochmolekularen Komplexes spielen [63].

4.3 Charakterisierung der Kinase Sat4p

Die Ser/Thr-PKase Sat4p wurde ursprünglich als ein Protein identifiziert, welches eine Rolle bei der Salztoleranz und Stabilisierung von Plasmamembran-Transportern spielt [110,170]. Diese Funktionen implizieren zwar eine Präsenz von Sat4p im Cytoplasma, experimentelle Daten zur intrazellulären Lokalisation dieser Kinase fehlten jedoch bisher. In den initialen bioinformatischen Analysen fiel Sat4p durch eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für den Import in das mt Kompartiment auf (vgl. 3.1.1). Die Lokalisationsstudien sowie die proteinbiochemische Charakterisierung von Sat4p sollen zunächst Gegenstand der Diskussion sein.

Welche intrazelluläre Lokalisation und proteinbiochemischen Besonderheiten besitzt die Kinase Sat4p?

Die intrazelluläre Lokalisation von Sat4p wurde unter Verwendung einer cMyc-getaggten Variante, welche unter der Kontrolle des authentischen Promotors steht, untersucht. Obgleich die Kinase überwiegend in der cytoplasmatischen Fraktion vorliegt, kann sie in geringerer Konzentration auch in hochreinen Mitochondrien nachgewiesen werden. Dies ist konsistent mit den bioinformatischen Analysen, bei welchen beispielsweise durch MITOPROT [109] eine Wahrscheinlichkeit von 96 % für eine mt Lokalisation angegeben wird. Die Ergebnisse der Arbeit sprechen dafür, dass es sich um eine dual lokalisierte Kinase handelt, welche in verschiedenen Kompartimenten unterschiedliche Funktionen erfüllen könnte.

Bei den Analysen wurde Sat4p in verschiedenen Laufformen in der SDS-PAGE detektiert, was auf posttranslationale Modifikationen der Kinase hinweisen könnte. Obgleich die

Identität der verschiedenen Banden nicht abschließend geklärt werden konnte, wurde durch eine λ -PPase-Behandlung gezeigt, dass es sich bei einer der detektierten Banden um eine phosphorylierte Isoform handelt (Abb. 22). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit *in silico* Analysen (Prosit scan; [129]), welche insbesondere für Phosphorylierungen eine große Anzahl putativer Modifizierungsstellen vorhersagen. Sat4p ist somit selbst Target der Phosphorylierung, welche an der Regulation der Aktivität der Kinase beteiligt sein könnte. Des Weiteren fiel bei der *in silico* Analyse der Sat4p-Sequenz die hohe Anzahl von 16 Cys-Resten sowie die Vorhersage von bis zu acht möglichen Disulfidbrücken (DiANNA; [128]) auf. Die Migrationsformen könnten verschiedene Oxidationsstufen von Sat4p repräsentieren, wie es für andere Cys-reiche Proteine bereits gezeigt wurde (z.B. [171]). Obgleich die Behandlung mit verschiedenen reduzierenden Agenzien keine Veränderung des Bandenmusters zeigte, kann eine unzureichende Reduktion vor oder eine Reoxidation während des Gellaufes nicht komplett ausgeschlossen werden. Interessant erscheint der hohe Cys-Gehalt auch vor dem Hintergrund, dass insbesondere für mt Kinasen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Signalmoleküle diskutiert werden [16]. Eine hohe ROS-Konzentration könnte durch die Veränderung der Reduktionsbedingungen die Tertiärstruktur der Kinase und so möglicherweise deren Aktivität beeinflussen. Diese Vermutung ist allerdings spekulativ und bedarf weiterer Analysen.

Die partielle Lokalisation von Sat4p in den Mitochondrien wirft die Frage auf, ob und welche möglichen Zielproteine oder Funktionen diese Kinase im mt Kompartiment hat. Zur Analyse der putativen mt Funktion von Sat4p wurden sowohl eine Deletionsmutante ($\Delta sat4$) als auch eine Überexpression unter Kontrolle des sehr starken konstitutiven *TET*-Promotors (Tet-Sat4) verwendet. Während eine Deletion im Verlust der Phosphorylierung der Zielproteine resultieren sollte, erlaubt die Überexpression der Kinase eine Analyse des Einflusses der Hyperphosphorylierung.

Welchen Einfluss hat Sat4p auf das mt Proteom?

Die komparativen DIGE-Analysen des mt Proteoms der Deletionsmutante $\Delta sat4$ zeigten keine wesentlichen Unterschiede zum WT. Mögliche Erklärungen sind die Existenz einer Kinase redundanter Funktion oder eine geringe Bedeutung der Sat4p-Aktivität unter den gewählten Kultivierungsbedingungen (YPE). Als eine alternative Herangehensweise wurden die Effekte der Überexpression der Kinase im Tet-Sat4-Stamm untersucht. Obgleich solch eine Überexpression auch die Gefahr unspezifischer Effekte birgt, ist sie für die funktionelle Untersuchung regulatorisch wirksamer Proteine durchaus geeignet [125,172], da Phosphorylierungen transient und stark abhängig vom aktuellen Zustand der Zelle sind. Die

Überexpressionsmutante zeigte nicht nur ein vermindertes Wachstum auf nicht-fermentierbaren C-Quellen, sondern auch Effekte auf ein sehr spezifisches mt Subproteom.

So wiesen beispielsweise Pil1p und Lsp1p im Tet-Sat4-Stamm eine höhere Abundanz auf als im WT. Für die beiden Proteine wurde eine Funktion bei der Regulation der Kinasen Pkh1p/Pkh2p während der Hitzeschockantwort beschrieben [132]. Außerdem wurde aufgrund der Assoziation von Pil1p und Lsp1p mit den Mitochondrien [173] sowie der Interaktion mit einem Sensor für die mt Dysfunktion (Rtg2p; [174]) eine Rolle beim Recycling mt Membranen bzw. der Aufnahme von Stoffen durch die Mitochondrien postuliert [60]. Sowohl Pil1p als auch Lsp1p konnten als phosphorylierte Proteine in den Mitochondrien identifiziert werden [58,60]. Des Weiteren wurde durch Proteinbindungsanalysen (*affinity capture MS*) eine Interaktion beider Proteine mit Sat4p gezeigt. Diese Befunde sprechen dafür, dass Pil1p und Lsp1p potentielle Zielproteine der Kinase sind. Trotzdem kann – insbesondere aufgrund der Funktion der Proteine in der Stressantwort – nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um sekundäre Effekte handelt.

Interessanterweise tragen nahezu alle anderen Proteine, deren Abundanz sich im Tet-Sat4-Stamm veränderte, entweder ein Fe/S-Cluster oder Liponsäure als prosthetische Gruppe. Die lipoylierten Proteine (Lat1p, Kgd2p und Gcv3p) zeigten dabei keine Änderungen in ihrer „*steady-state*“-Konzentration, sondern vielmehr in ihrem Spotmuster. Bei allen drei Proteinen akkumulierte die nicht-lipoylierte Isoform, während die Konzentration der lipoylierten Form deutlich abnahm. In den entsprechenden WT-Spots konnten die Lipoylierungsstellen der Proteine erstmals experimentell unter Nutzung von nano-LC MS/MS identifiziert werden. Die PDH-Untereinheit Lat1p trägt Liponsäure an Lys75. Diese Modifizierungsstelle wurde bereits anhand von Punktmutationsanalysen in der Hefe [136] sowie durch Sequenzvergleiche homologer Proteine anderer Organismen [175] postuliert. Als Lipoylierungsstelle von Kgd2p (Untereinheit der KGDH) konnte Lys114 identifiziert werden, welches homolog zur Modifizierungsstelle im entsprechenden *E. coli*-Enzym ist [137]. Der verminderte Anteil der lipoylierten Isoformen beider Enzyme resultierte in stark reduzierten Aktivitäten sowohl der KGDH als auch der PDH. Diese metabolische Einschränkung könnte auch das verminderte Wachstum auf nicht-fermentierbaren C-Quellen (YPE) erklären. Gcv3p – das dritte bekannte lipoylierte Protein – ist an Lys102 modifiziert. Diese Lipoylierungsstelle wurde bereits durch einen Vergleich zum gallinen H-Protein postuliert [176] und konnte in dieser Arbeit erstmals experimentell für das Hefeprotein nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde bei Überexpression von *SAT4* eine verminderte Konzentration für eine spezifische Gruppe mt Fe/S-Proteine („*aconitase-type*“) beobachtet. Sowohl Lys4p (Homoaconitase) als auch Aco1p (Aconitase) wiesen eine deutlich reduzierte Konzentration im Vergleich zum WT auf. Die geringe Abundanz der Aconitase spiegelte sich auch in ihrer

Aktivität im Tet-Sat4-Stamm wieder, die lediglich 10 % der WT-Aktivität betrug. Da Aco1p im Citratzyklus eine zentrale Rolle spielt, wäre deren Beeinträchtigung auch eine Erklärung für die verminderte Konzentration der Succinatdehydrogenase-Untereinheit Sdh2p, welche am gleichen Stoffwechselweg beteiligt ist. Eine Reihe von Citratzyklus-Intermediaten wird für anaplerotische Reaktionen des 2-Methylcitratzyklus benötigt [130], weshalb auch die darin involvierte Isocitratlyase Icl2p sekundär beeinträchtigt sein könnte. Neben der Funktion im Citratzyklus spielt die Aconitase aber auch für die Erhaltung der Integrität der mtDNA eine entscheidende Rolle [177]. Dass es sich bei den beobachteten Proteomveränderungen um unspezifische Effekte aufgrund der Bildung von *rho*⁰-Zellen handeln könnte, kann jedoch ausgeschlossen werden. Der Tet-Sat4-Stamm wies im Vergleich zum WT keinen erhöhten Verlust der mtDNA bei Langzeitkultivierung auf (Daten nicht gezeigt).

Obgleich die Veränderungen nur bei der Überexpression von Sat4p sehr deutlich waren, konnten zumindest bei den Enzymaktivitätsmessungen auch inverse Effekte in $\Delta sat4$ verzeichnet werden. Vermutlich hat die Hyperphosphorylierung des Targets durch die Überexpression von Sat4p unter den gewählten Bedingungen stärkere Auswirkungen als eine fehlende Phosphorylierung. Ferner spricht dieser inverse Effekt aber auch dafür, dass es sich nicht um unspezifische Folgen der Sat4p-Überexpression handelt.

Welche regulatorische Rolle in den Mitochondrien könnte für Sat4p postuliert werden?

Die Effekte der Sat4p-Überexpression auf das mt Proteom ähneln interessanterweise stark jenen, die bei Störungen der mt Fe/S-Cluster-Assemblierung gezeigt wurden. Nahezu die gleiche Gruppe von Proteinen wie im Tet-Sat4-Stamm ist bei einer Deletion von Isa1p/Isa2p oder Iba57b betroffen [178,179]. Diese drei Proteine sind essentielle Faktoren für die Bildung von Fe/S-Clustern an Aconitase-ähnlichen Proteinen (Aco1p und Lys4p) sowie S-Adenosylmethionin-Enzymen (Lip5p und Bio2p) [180]. Eine gestörte Assemblierung des katalytisch bedeutenden Fe/S-Clusters beeinflusst vermutlich nicht nur die enzymatische Aktivität, sondern könnte auch in einer vermehrten Degradation und damit verminderten „steady-state“-Konzentration der unvollständig assemblierten Enzyme resultieren, wie es bei Aco1p und Lys4p der Fall ist. Die Lipoatsynthase Lip5p und die Biotinsynthase Bio2p wurden unter den geänderten Proteinspots der 2D-PAGE zwar nicht identifiziert. Dies könnte aber einer geringen Abundanz oder bestimmten proteinbiochemischen Eigenschaften dieser Proteine geschuldet sein. Lip5p liegt beispielsweise mit seinem sehr basischen pI (~10,3) in einem Bereich, der in der IEF nur unzureichend aufgetrennt werden kann. Auch in anderen publizierten 2D-Analysen des mt Proteoms von *S. cerevisiae* konnten Lip5p und Bio2p bisher nicht separiert bzw. identifiziert werden [58,107]. Die fehlende Lipoylierung von Lat1p, Kgd2p und Gcv3p im Tet-Sat4-Stamm könnte jedoch durch eine eingeschränkte Funktionalität von

Lip5p – ein essentielles Enzym für die Liponsäurebiosynthese [135] – erklärt werden. Diese Aussage wird durch HPLC-Messungen des Liponsäuregehaltes in Mitochondrien unterstützt, bei denen die Lipoat-Konzentrationen im Tet-Sat4-Stamm deutlich geringer als im WT und mit denen einer $\Delta lip5$ -Mutante vergleichbar waren (persönliche Mitteilung U. Krause-Buchholz). Eine gestörte Funktion der Biotinsynthase (Bio2p) hat in den durchgeführten 2D-Analysen des mt Proteoms möglicherweise aus zwei Gründen keinen sichtbaren Effekt: Zum einen ist der Großteil der biotinylierten Proteine cytoplasmatisch lokalisiert (SGD, [100]). Zum anderen kann Biotin – im Gegensatz zu Liponsäure – aus dem Vollmedium assimiliert werden [181].

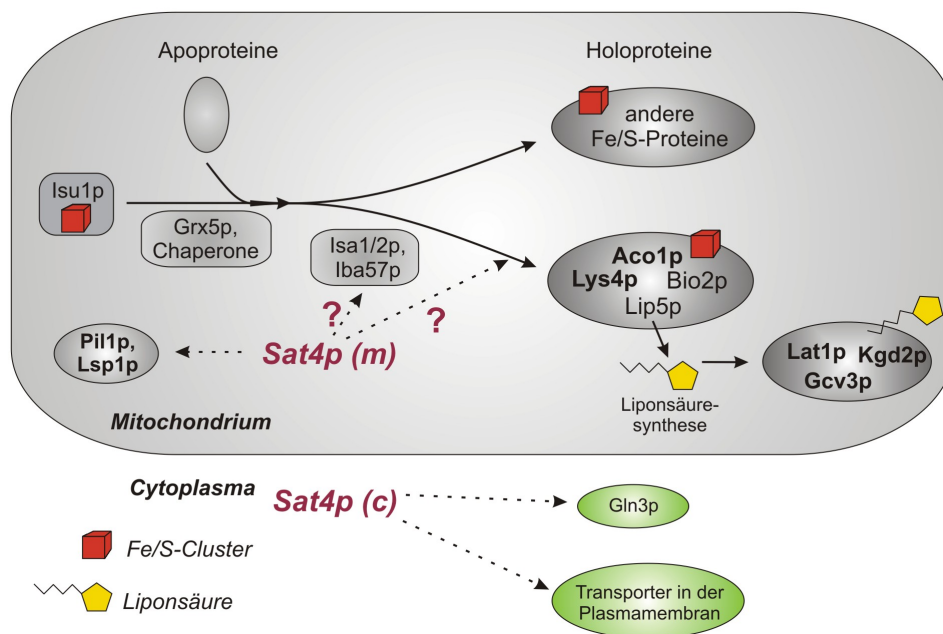


Abb. 30 Modell der putativen Funktion der Kinase Sat4p in den Mitochondrien.

Die Proteomanalysen deuten auf eine regulatorische Funktion des teilweise mt lokalisierten Sat4p (*Sat4p(m)*) in den späten Schritten der Assemblierung von Fe/S-Clustern an Aconitase-ähnlichen Proteinen (Aco1p, Lys4p) und S-Adenosylmethionin-Enzymen (Lip5p, Bio2p) hin. Sat4p könnte dabei direkt oder indirekt durch Modulation der Funktion von Isa1/2p oder Iba57p wirken, da diese Proteine essentiell für diesen Prozess sind [180]. Die Störung der Funktionalität der Lipoatsynthese Lip5p würde nachfolgend zu der fehlenden Lipoylierung der Proteine Lat1p, Kgd2p und Gcv3p führen. Weitere putative Sat4p-Targets im Mitochondrium sind die Proteine Pil1p und Lsp1p. Das cytoplasmatisch lokalisierte Sat4p (*Sat4p(c)*) könnte an der Regulation von Plasmamembran-Transportern [110,170] und Gln3p [182] beteiligt sein. (Abbildung modifiziert nach [180])

Zusammenfassend könnte als mt Funktion von Sat4p eine regulatorische Rolle in den späten Assemblierungsschritten einer spezifischen Gruppe von Fe/S-Proteinen postuliert werden (Abb. 30). Ein unspezifischer Effekt von Sat4p auf die Bildung oder eine Beteiligung an den frühen Schritten der Assemblierung der Fe/S-Cluster sind sehr unwahrscheinlich, da andere mt Fe/S-Proteine wie beispielsweise Rip1p vom Komplex III der Atmungskette nicht betroffen sind. Das mt lokalisierte Sat4p könnte am finalen Schritt der Fe/S-Assemblierung entweder

direkt regulatorisch wirken oder indirekt durch die Modulation der Aktivität von Isa1p/Isa2p oder Iba57p (vgl. Abb. 30). Darüber hinaus stellen die Proteine Pil1p und Lsp1p potentielle Sat4p-Targets im Mitochondrium dar. Eine Verknüpfung zwischen diesen beiden Proteinen und der Fe/S-Cluster-Assemblierung konnte in der Literatur jedoch nicht gefunden werden. Ob es sich bei den Änderungen von Pil1p und Lsp1p um sekundäre Auswirkungen handelt, könnte beispielsweise durch die Proteomanalyse einer $\Delta/ba57$ oder $\Delta/isa1/2$ -Deletionsmutante untersucht werden. Neben der postulierten Rolle von Sat4p im mt Metabolismus kann der cytoplasmatische Anteil der Kinase an der Regulation anderer Proteine beteiligt sein (Abb. 30; [110,170,182]).

Trotz der Ergebnisse hinsichtlich einer partieller mt Lokalisierung von Sat4p kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass der extra-mitochondrial lokalisierte Anteil der Kinase zu der beobachteten Beeinflussung des spezifischen mt Subproteoms führt. Denkbar wäre beispielsweise die Phosphorylierung eines cytoplasmatischen Targets, welches dann in Folge ein Signal in die Mitochondrien übermittelt. Des Weiteren könnte die Konzentration der betroffenen Proteine im Tet-Sat4-Stamm durch eine Beeinträchtigung der Transkription im Zellkern verursacht werden. Eine direkte Beteiligung von Sat4p als Transkriptionsfaktor kann jedoch nahezu ausgeschlossen werden, da das Protein weder eine typische Kernlokalisationssequenz noch ein DNA-Bindemotiv besitzt (SGD, [100]). Sat4p könnte auch einen indirekten Effekt auf die Transkription haben, beispielsweise durch die kürzlich beschriebene Funktion der Kinase bei der Regulation des Transkriptionsaktivators Gln3p [182]. Die Gruppe der im Tet-Sat4-Stamm affizierten Proteine zeigen jedoch weder eine Coregulation auf mRNA-Ebene, noch stehen deren Gene unter der Kontrolle eines gemeinsamen Transkriptionsaktivators („*PatMatch*“-Funktion in der SGD, [100]). Es ist deshalb sehr unwahrscheinlich, dass Sat4p auf Ebene der Transkription zu den beobachteten Änderungen führt.

5 Zusammenfassung

Über die Proteinphosphorylierung in den Mitochondrien der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist im Gegensatz zu anderen Kompartimenten nur wenig bekannt. Insbesondere hinsichtlich der physiologischen Bedeutung sowie den an der Modifikation beteiligten Enzymen sind kaum Daten verfügbar. Vor diesem Hintergrund stand die Identifizierung und molekularbiologische Charakterisierung mitochondrialer Proteinkinasen (PKasen) und Proteinphosphatasen (PPasen) im Fokus dieser Arbeit. Unter Verwendung komparativer 2D-DIGE-Analysen konnten zwei Strategien erfolgreich verfolgt werden: Zum einen wurde die Konsequenz einer Gendeletion von ausgewählten PKasen bzw. PPasen mit putativer mitochondrialer Lokalisation untersucht. Dabei gelang es, die an der *in vivo* Regulation des Pyruvatdehydrogenase(PDH)-Komplexes beteiligten Enzyme erstmalig zu identifizieren und im Folgenden deren regulatorisches Zusammenspiel umfassend zu analysieren. Zum anderen wurde in einem inversen Ansatz beispielhaft für die PKase Sat4p untersucht, welche Auswirkungen eine Überexpression dieser Kinase auf das mt Proteom hat.

Erste Hinweise, welche zur Identifizierung der PDH-Kinasen (Pkp1p und Pkp2p) bzw. PDH-Phosphatasen (Ppp1p und Ppp2p) führten, lieferten die signifikanten Spotänderungen von Pda1p (E1 α -Untereinheit des PDH-Komplexes) in den 2D-DIGE-Analysen. Im Folgenden wurde die mitochondriale Lokalisation der vier regulatorischen Enzyme unter Verwendung Epitop-getaggtter Varianten nachgewiesen sowie Pda1p in unabhängigen phosphospezifischen Analysen als Target der Phosphorylierung verifiziert. Die Phosphorylierungsstelle von Pda1p konnte massenspektrometrisch dem Serin313 zugeordnet werden. PDH-Aktivitätsmessungen zeigten, dass die Phosphorylierung von Pda1p den PDH-Komplex inaktiviert, während eine Dephosphorylierung zur Aktivierung führt. Dabei war der Einfluss der Deletion der PDH-Kinasen bzw. der PDH-Phosphatasen unterschiedlich stark ausgeprägt. Während Ppp1p und Ppp2p partiell redundante Funktionen besitzen, lassen die Analysen komplementäre Aktivitäten von Pkp1p und Pkp2p vermuten. Eine physikalische Interaktion der beiden Kinasen wurde *in vivo* nachgewiesen und deutet auf die Bildung funktioneller Heteromere hin. Durch Analysen in der 2D-BN/SDS-PAGE konnte eine Assoziation der PDH-Kinasen sowie PDH-Phosphatasen mit dem hochmolekularen, etwa 8 MDa großen PDH-Komplex sowie mit PDH-Subkomplexen geringeren Molekulargewichts gezeigt werden.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit ermöglichten in Verbindung mit denen eigener Vorarbeiten die Erstellung eines Modells zur PDH-Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Neben der Aktivitätsregulation durch die von Pkp1p/Pkp2p bzw. Ppp1p/Ppp2p katalysierte

Phosphorylierung wird eine Funktion der regulatorischen Enzyme – insbesondere der PDH-Kinasen – an der Assemblierung bzw. Stabilisierung des PDH-Komplexes postuliert. Es konnte somit gezeigt werden, dass in der Hefe ein ähnlicher, aber nicht identischer Regulationsmechanismus vorliegt wie in höheren Eukaryoten.

Die zweite Strategie, welche in dieser Arbeit exemplarisch für eine PKase verfolgt wurde, führte zur Identifikation einer bislang unbekannten Funktion der Kinase Sat4p in den Mitochondrien. Es konnte gezeigt werden, dass Sat4p dual lokalisiert in der cytoplasmatischen sowie mitochondrialen Fraktion vorliegt und selbst Target der Phosphorylierung ist. Die Überexpression von Sat4p führte nicht nur zu einem verminderten Wachstum auf nicht-fermentierbaren Medien, sondern auch zur Beeinflussung spezifischer mitochondrialer Proteingruppen. Während die Spots der Proteine Pil1p und Lsp1p eine höhere Intensität zeigten, wiesen die Fe/S-Proteine Aco1p und Lys4p eine verminderte „*steady-state*“-Konzentration auf. Darüber hinaus lagen die Proteine, welche Liponsäure als prosthetische Gruppe tragen (Lat1p, Kgd2p und Gcv3p), im Tet-Sat4-Stamm vorwiegend in ihrer nicht-lipoylierten Form vor. Die Lipoylierungsstellen aller drei Proteine konnten im Wildtyp unter Nutzung von nanoLC-MS/MS erstmals experimentell bestimmt und Lys75 (Lat1p), Lys114 (Kgd2p) bzw. Lys102 (Gcv3p) zugeordnet werden. Die fehlende Lipoylierung der Proteine bzw. die verminderte Proteinkonzentration der Aconitase führte zu einer stark verminderten Aktivität der betroffenen Enzymkomplexe.

Neben den in der Literatur beschriebenen putativen Funktionen von Sat4p bei der Regulation cytoplasmatischer Proteine wurde basierend auf den Erkenntnissen der Analysen eine spezifische Funktion der Kinase in den Mitochondrien postuliert. Das Modell schlägt eine Rolle von Sat4p in den späten Schritten der Maturation einer spezifischen Gruppe von mitochondrialen Fe/S-Proteinen vor. Die Beeinträchtigung der Lipoatsynthese Lip5p, welche neben Aco1p und Lys4p ebenfalls zu dieser Gruppe gehört, führt vermutlich sekundär zum beobachteten Verlust der Lipoylierung von Lat1p, Kgd2p und Gcv3p.

6 Literatur

- [1] Cherry, J.M. (1995) Genetic nomenclature guide. *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Genet* p.11-12.
- [2] Krishna, R.G., and Wold, F. (1993) Post-translational modification of proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* (**67**): p.265-298.
- [3] Jensen, O.N. (2006) Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* (**7**): p.391-403.
- [4] Reinders, J., and Sickmann, A. (2005) State-of-the-art in phosphoproteomics. *Proteomics* (**5**): p.4052-4061.
- [5] Fischer, E.H., and Krebs, E.G. (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem* (**216**): p.121-132.
- [6] Ptacek, J., and Snyder, M. (2006) Charging it up: global analysis of protein phosphorylation. *Trends Genet* (**22**): p.545-554.
- [7] Kalume, D.E., Molina, H., and Pandey, A. (2003) Tackling the phosphoproteome: tools and strategies. *Curr Opin Chem Biol* (**7**): p.64-69.
- [8] Sickmann, A., and Meyer, H.E. (2001) Phosphoamino acid analysis. *Proteomics* (**1**): p.200-206.
- [9] Matthews, H.R. (1995) Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacol Ther* (**67**): p.323-350.
- [10] Hunter, T. (1998) The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (**353**): p.583-605.
- [11] Raggiaschi, R., Gotta, S., and Terstappen, G.C. (2005) Phosphoproteome analysis. *Biosci Rep* (**25**): p.33-44.
- [12] Tomaska, L. (2000) Mitochondrial protein phosphorylation: lessons from yeasts. *Gene* (**255**): p.59-64.
- [13] Sopko, R., and Andrews, B.J. (2008) Linking the kinome and phosphorylome--a comprehensive review of approaches to find kinase targets. *Mol Biosyst* (**4**): p.920-933.
- [14] Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* (**80**): p.225-236.
- [15] Cohen, P. (1988) Protein phosphorylation and hormone action. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* (**234**): p.115-144.
- [16] Pagliarini, D.J., and Dixon, J.E. (2006) Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends Biochem Sci* (**31**): p.26-34.

-
- [17] Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002) Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* (27): p.514-520.
- [18] Hanks, S.K., and Quinn, A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* (200): p.38-62.
- [19] Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* (9): p.576-596.
- [20] Hunter, T., and Plowman, G.D. (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* (22): p.18-22.
- [21] Rubenstein, E.M., and Schmidt, M.C. (2007) Mechanisms regulating the protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* (6): p.571-583.
- [22] Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G. (2004) Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* (15): p.661-675.
- [23] Sakumoto, N., Matsuoka, I., Mukai, Y., Ogawa, N., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2002) A series of double disruptants for protein phosphatase genes in *Saccharomyces cerevisiae* and their phenotypic analysis. *Yeast* (19): p.587-599.
- [24] Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* (58): p.453-508.
- [25] Zhu, H., Klemic, J.F., Chang, S., Bertone, P., Casamayor, A., Klemic, K.G., Smith, D., Gerstein, M., Reed, M.A., and Snyder, M. (2000) Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet* (26): p.283-289.
- [26] Sakumoto, N., Mukai, Y., Uchida, K., Kouchi, T., Kuwajima, J., Nakagawa, Y., Sugioka, S., Yamamoto, E., Furuyama, T., Mizubuchi, H., Ohsugi, N., Sakuno, T., Kikuchi, K., Matsuoka, I., Ogawa, N., Kaneko, Y., and Harashima, S. (1999) A series of protein phosphatase gene disruptants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (15): p.1669-1679.
- [27] Moorhead, G.B., Trinkle-Mulcahy, L., and Ulke-Lemee, A. (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* (8): p.234-244.
- [28] Dimmer, K.S., and Rapaport, D. (2008) Proteomic view of mitochondrial function. *Genome Biol* (9): p.209.
- [29] Scheffler, I.E. (2008) Mitochondria. Second Edition. *Wiley*, New Jersey.
- [30] McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006) Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* (16): p.R551-560.
- [31] Linn, T.C., Pettit, F.H., and Reed, L.J. (1969) Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (62): p.234-241.
- [32] Harris, R.A., Paxton, R., Powell, S.M., Goodwin, G.W., Kuntz, M.J., and Han, A.C. (1986) Regulation of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex by covalent modification. *Adv Enzyme Regul* (25): p.219-237.

-
- [33] Chen, R., Fearnley, I.M., Peak-Chew, S.Y., and Walker, J.E. (2004) The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* (**279**): p.26036-26045.
- [34] Schulenberg, B., Aggeler, R., Beechem, J.M., Capaldi, R.A., and Patton, W.F. (2003) Analysis of steady-state protein phosphorylation in mitochondria using a novel fluorescent phosphosensor dye. *J Biol Chem* (**278**): p.27251-27255.
- [35] Steenaart, N.A., and Shore, G.C. (1997) Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV is phosphorylated by an endogenous kinase. *FEBS Lett* (**415**): p.294-298.
- [36] Hojlund, K., Wrzesinski, K., Larsen, P.M., Fey, S.J., Roepstorff, P., Handberg, A., Dela, F., Vinten, J., McCormack, J.G., Reynet, C., and Beck-Nielsen, H. (2003) Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. *J Biol Chem* (**278**): p.10436-10442.
- [37] Struglics, A., Fredlund, K.M., Moller, I.M., and Allen, J.F. (1998) Two subunits of the F0F1-ATPase are phosphorylated in the inner mitochondrial membrane. *Biochem Biophys Res Commun* (**243**): p.664-668.
- [38] Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L.J., Taylor, S.S., Scott, J.D., and Korsmeyer, S.J. (1999) Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* (**3**): p.413-422.
- [39] Kanamaru, Y., Sekine, S., Ichijo, H., and Takeda, K. (2012) The Phosphorylation-Dependent Regulation of Mitochondrial Proteins in Stress Responses. *J Signal Transduct* (**2012**): p.931215.
- [40] Lee, I., Salomon, A.R., Ficarro, S., Mathes, I., Lottspeich, F., Grossman, L.I., and Huttemann, M. (2005) cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J Biol Chem* (**280**): p.6094-6100.
- [41] Kresze, G.B., and Ronft, H. (1981) Pyruvate dehydrogenase complex from baker's yeast. 1. Purification and some kinetic and regulatory properties. *Eur J Biochem* (**119**): p.573-579.
- [42] Stoops, J.K., Cheng, R.H., Yazdi, M.A., Maeng, C.Y., Schroeter, J.P., Klueppelberg, U., Kolodziej, S.J., Baker, T.S., and Reed, L.J. (1997) On the unique structural organization of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex. *J Biol Chem* (**272**): p.5757-5764.
- [43] Patel, M.S., and Korotchkina, L.G. (2001) Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Exp Mol Med* (**33**): p.191-197.
- [44] James, A.G., Cook, R.M., West, S.M., and Lindsay, J.G. (1995) The pyruvate dehydrogenase complex of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by phosphorylation. *FEBS Lett* (**373**): p.111-114.
- [45] Kolobova, E., Tuganova, A., Boulatnikov, I., and Popov, K.M. (2001) Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochem J* (**358**): p.69-77.
- [46] Gudi, R., Bowker-Kinley, M.M., Kedishvili, N.Y., Zhao, Y., and Popov, K.M. (1995) Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans. *J Biol Chem* (**270**): p.28989-28994.

-
- [47] Holness, M.J., and Sugden, M.C. (2003) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans* (31): p.1143-1151.
- [48] Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* (274): p.546, 563-547.
- [49] Zsurka, G., Gregan, J., and Schweyen, R.J. (2001) The human mitochondrial Mrs2 protein functionally substitutes for its yeast homologue, a candidate magnesium transporter. *Genomics* (72): p.158-168.
- [50] Bonnefoy, N., Kermorgant, M., Groudinsky, O., Minet, M., Slonimski, P.P., and Dujardin, G. (1994) Cloning of a human gene involved in cytochrome oxidase assembly by functional complementation of an oxa1- mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (91): p.11978-11982.
- [51] Petruzzella, V., Tiranti, V., Fernandez, P., Ianna, P., Carrozzo, R., and Zeviani, M. (1998) Identification and characterization of human cDNAs specific to BCS1, PET112, SCO1, COX15, and COX11, five genes involved in the formation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Genomics* (54): p.494-504.
- [52] Paret, C., Ostermann, K., Krause-Buchholz, U., Rentzsch, A., and Rödel, G. (1999) Human members of the SCO1 gene family: complementation analysis in yeast and intracellular localization. *FEBS Lett* (447): p.65-70.
- [53] Müller, G., and Bandlow, W. (1987) Protein phosphorylation in yeast mitochondria: cAMP-dependence, submitochondrial localization and substrates of mitochondrial protein kinases. *Yeast* (3): p.161-174.
- [54] da Silva, L.P., Lindahl, M., Lundin, M., and Baltscheffsky, H. (1991) Protein phosphorylation by inorganic pyrophosphate in yeast mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* (178): p.1359-1364.
- [55] Albuquerque, C.P., Smolka, M.B., Payne, S.H., Bafna, V., Eng, J., and Zhou, H. (2008) A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics* (7): p.1389-1396.
- [56] Chi, A., Huttenhower, C., Geer, L.Y., Coon, J.J., Syka, J.E., Bai, D.L., Shabanowitz, J., Burke, D.J., Troyanskaya, O.G., and Hunt, D.F. (2007) Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* (104): p.2193-2198.
- [57] Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and White, F.M. (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* (20): p.301-305.
- [58] Reinders, J., Wagner, K., Zahedi, R.P., Stojanovski, D., Eylich, B., van der Laan, M., Rehling, P., Sickmann, A., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2007) Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase. *Mol Cell Proteomics* (6): p.1896-1906.
- [59] Krause-Buchholz, U., Becker, J.S., Zoriy, M., Pickhardt, C., Przybylski, M., Rödel, G., and Becker, J.S. (2006) Detection of phosphorylated subunits by combined LA-ICP-

- MS and MALDI-FTICR-MS analysis in yeast mitochondrial membrane complexes separated by blue native/SDS-PAGE. *Int J Mass Spectrom* (**248**): p.56-60.
- [60] Ohlmeier, S., Hiltunen, J.K., and Bergmann, U. (2010) Protein phosphorylation in mitochondria --a study on fermentative and respiratory growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis* (**31**): p.2869-2881.
- [61] Rao, S., Gerbeth, C., Harbauer, A., Mikropoulou, D., Meisinger, C., and Schmidt, O. (2011) Signaling at the gate: phosphorylation of the mitochondrial protein import machinery. *Cell Cycle* (**10**): p.2083-2090.
- [62] Schmidt, O., Harbauer, A.B., Rao, S., Eyrich, B., Zahedi, R.P., Stojanovski, D., Schonfisch, B., Guiard, B., Sickmann, A., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2011) Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell* (**144**): p.227-239.
- [63] Krause-Buchholz, U., Gey, U., Wünschmann, J., Becker, S., and Rödel, G. (2006) YIL042c and YOR090c encode the kinase and phosphatase of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex. *FEBS Lett* (**580**): p.2553-2560.
- [64] Delom, F., and Chevet, E. (2006) Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome Sci* (**4**): p.15.
- [65] Hathaway, D.R., and Haerberle, J.R. (1985) A radioimmunoblotting method for measuring myosin light chain phosphorylation levels in smooth muscle. *Am J Physiol* (**249**): p.C345-351.
- [66] Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* (**1**): p.376-386.
- [67] Sano, A., and Nakamura, H. (2004) Chemo-affinity of titania for the column-switching HPLC analysis of phosphopeptides. *Anal Sci* (**20**): p.565-566.
- [68] McLachlin, D.T., and Chait, B.T. (2001) Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* (**5**): p.591-602.
- [69] Schmidt, S.R., Schweikart, F., and Andersson, M.E. (2007) Current methods for phosphoprotein isolation and enrichment. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* (**849**): p.154-162.
- [70] Hopper, R.K., Carroll, S., Aponte, A.M., Johnson, D.T., French, S., Shen, R.F., Witzmann, F.A., Harris, R.A., and Balaban, R.S. (2006) Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry* (**45**): p.2524-2536.
- [71] Murray, J., Marusich, M.F., Capaldi, R.A., and Aggeler, R. (2004) Focused proteomics: monoclonal antibody-based isolation of the oxidative phosphorylation machinery and detection of phosphoproteins using a fluorescent phosphoprotein gel stain. *Electrophoresis* (**25**): p.2520-2525.
- [72] Gronborg, M., Kristiansen, T.Z., Stensballe, A., Andersen, J.S., Ohara, O., Mann, M., Jensen, O.N., and Pandey, A. (2002) A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Mol Cell Proteomics* (**1**): p.517-527.

- [73] Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* (**21**): p.1037-1053.
- [74] Hunzinger, C., Schratzenholz, A., Poznanovic, S., Schwall, G.P., and Stegmann, W. (2006) Comparison of different separation technologies for proteome analyses: isoform resolution as a prerequisite for the definition of protein biomarkers on the level of posttranslational modifications. *J Chromatogr A* (**1123**): p.170-181.
- [75] Minden, J.S., Dowd, S.R., Meyer, H.E., and Stühler, K. (2009) Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis* (**30 Suppl 1**): p.S156-161.
- [76] Belli, G., Gari, E., Aldea, M., and Herrero, E. (1998) Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* (**14**): p.1127-1138.
- [77] Wolf, K., Dujon, B., and Slonimski, P.P. (1973) Mitochondrial genetics. V. Multifactorial mitochondrial crosses involving a mutation conferring paromomycin-resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* (**125**): p.53-90.
- [78] Gey, U. (2005) Mitochondriale Phosphoproteomics: Untersuchungen zur Phosphorylierung mitochondrialer Enzymkomplexe in *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, TU Dresden.
- [79] Wünschmann, J. (2004) Untersuchungen zur Phosphorylierung mitochondrialer Proteine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, TU Dresden.
- [80] Huhn, S. (2006) Phosphorylierung mitochondrialer Enzymkomplexe in *Saccharomyces cerevisiae*: Analyse zur Funktion putativer mitochondrialer Proteinkinasen und -phosphatasen. *Diplomarbeit*, TU Dresden.
- [81] Thierfelder, S. (2008) Das mitochondriale Phosphoproteom von *Saccharomyces cerevisiae*: Molekularbiologische Analysen zum Einfluss der Proteinkinasen Smk1p, Sat4p und Kin82p. *Diplomarbeit*, TU Dresden.
- [82] Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C., and Philippsen, P. (1997) Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (**13**): p.1065-1075.
- [83] Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* (**350**): p.87-96.
- [84] Daum, G., Böhni, P.C., and Schatz, G. (1982) Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem* (**257**): p.13028-13033.
- [85] Meisinger, C., Sommer, T., and Pfanner, N. (2000) Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal Biochem* (**287**): p.339-342.
- [86] Wessel, D., and Flügge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* (**138**): p.141-143.

-
- [87] Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* (24): p.218-229.
- [88] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (227): p.680-685.
- [89] Schagger, H. (2001) Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol* (65): p.231-244.
- [90] Schagger, H., and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* (199): p.223-231.
- [91] Wittig, I., Karas, M., and Schagger, H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics* (6): p.1215-1225.
- [92] Henderson, N.S., Nijtmans, L.G., Lindsay, J.G., Lamantea, E., Zeviani, M., and Holt, I.J. (2000) Separation of intact pyruvate dehydrogenase complex using blue native agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis* (21): p.2925-2931.
- [93] Agrawal, G.K., and Thelen, J.J. (2005) Development of a simplified, economical polyacrylamide gel staining protocol for phosphoproteins. *Proteomics* (5): p.4684-4688.
- [94] Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* (9): p.255-262.
- [95] Sheline, C.T., and Choi, D.W. (2004) Cu²⁺ toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. *Ann Neurol* (55): p.645-653.
- [96] Drapier, J.C., and Hibbs, J.B., Jr. (1996) Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods Enzymol* (269): p.26-36.
- [97] Czapalla, C., Mansukoski, H., Riedl, T., Thiel, D., Krause, E., and Hoflack, B. (2006) Proteomic analysis of lysosomal acid hydrolases secreted by osteoclasts: implications for lytic enzyme transport and bone metabolism. *Mol Cell Proteomics* (5): p.134-143.
- [98] UniProtConsortium (2010) The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Res* (38): p.D142-148.
- [99] Gey, U., Czapalla, C., Hoflack, B., Rodel, G., and Krause-Buchholz, U. (2008) Yeast pyruvate dehydrogenase complex is regulated by a concerted activity of two kinases and two phosphatases. *J Biol Chem* (283): p.9759-9767.
- [100] Christie, K.R., Weng, S., Balakrishnan, R., Costanzo, M.C., Dolinski, K., Dwight, S.S., Engel, S.R., Feierbach, B., Fisk, D.G., Hirschman, J.E., Hong, E.L., Issel-Tarver, L., Nash, R., Sethuraman, A., Starr, B., Theesfeld, C.L., Andrada, R., Binkley, G., Dong, Q., Lane, C., Schroeder, M., Botstein, D., and Cherry, J.M. (2004) Saccharomyces Genome Database (SGD) provides tools to identify and analyze sequences from *Saccharomyces cerevisiae* and related sequences from other organisms. *Nucleic Acids Res* (32): p.D311-314.

-
- [101] Prokisch, H., Scharfe, C., Camp, D.G., 2nd, Xiao, W., David, L., Andreoli, C., Monroe, M.E., Moore, R.J., Gritsenko, M.A., Kozany, C., Hixson, K.K., Mottaz, H.M., Zischka, H., Ueffing, M., Herman, Z.S., Davis, R.W., Meitinger, T., Oefner, P.J., Smith, R.D., and Steinmetz, L.M. (2004) Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol* (2): p.e160.
- [102] Reinders, J., Zahedi, R.P., Pfanner, N., Meisinger, C., and Sickmann, A. (2006) Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res* (5): p.1543-1554.
- [103] Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* (100): p.13207-13212.
- [104] Cheng, A., Ross, K.E., Kaldis, P., and Solomon, M.J. (1999) Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev* (13): p.2946-2957.
- [105] Ruan, H., Yan, Z., Sun, H., and Jiang, L. (2007) The YCR079w gene confers a rapamycin-resistant function and encodes the sixth type 2C protein phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* (7): p.209-215.
- [106] Jiang, L., Whiteway, M., Ramos, C., Rodriguez-Medina, J.R., and Shen, S.H. (2002) The YHR076w gene encodes a type 2C protein phosphatase and represents the seventh PP2C gene in budding yeast. *FEBS Lett* (527): p.323-325.
- [107] Ohlmeier, S., Kastaniotis, A.J., Hiltunen, J.K., and Bergmann, U. (2004) The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. *J Biol Chem* (279): p.3956-3979.
- [108] Guan, K.L., Deschenes, R.J., Qiu, H., and Dixon, J.E. (1991) Cloning and expression of a yeast protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* (266): p.12964-12970.
- [109] Claros, M.G., and Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* (241): p.779-786.
- [110] Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R., and Serrano, R. (1999) A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol Cell Biol* (19): p.3328-3337.
- [111] Rutter, J., Probst, B.L., and McKnight, S.L. (2002) Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. *Cell* (111): p.17-28.
- [112] Ramos, C.W., Guldener, U., Klein, S., Hegemann, J.H., Gonzalez, S., and Rodriguez-Medina, J.R. (2000) Molecular analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* YHR076w gene. *IUBMB Life* (50): p.371-377.
- [113] Wilson, L.K., Benton, B.M., Zhou, S., Thorner, J., and Martin, G.S. (1995) The yeast immunophilin Fpr3 is a physiological substrate of the tyrosine-specific phosphoprotein phosphatase Ptp1. *J Biol Chem* (270): p.25185-25193.
- [114] Hadfield, C., Jordan, B.E., Mount, R.C., Pretorius, G.H., and Burak, E. (1990) G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* (18): p.303-313.

-
- [115] Gruhler, A., Olsen, J.V., Mohammed, S., Mortensen, P., Faergeman, N.J., Mann, M., and Jensen, O.N. (2005) Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol Cell Proteomics* (4): p.310-327.
- [116] Li, X., Gerber, S.A., Rudner, A.D., Beausoleil, S.A., Haas, W., Villen, J., Elias, J.E., and Gygi, S.P. (2007) Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *J Proteome Res* (6): p.1190-1197.
- [117] Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S.H., and Zhou, H. (2007) Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (104): p.10364-10369.
- [118] Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (23): p.2947-2948.
- [119] Margineantu, D.H., Brown, R.M., Brown, G.K., Marcus, A.H., and Capaldi, R.A. (2002) Heterogeneous distribution of pyruvate dehydrogenase in the matrix of mitochondria. *Mitochondrion* (1): p.327-338.
- [120] Tal, R., Winter, G., Ecker, N., Klionsky, D.J., and Abeliovich, H. (2007) Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival. *J Biol Chem* (282): p.5617-5624.
- [121] Uhlinger, D.J., Yang, C.Y., and Reed, L.J. (1986) Phosphorylation-dephosphorylation of pyruvate dehydrogenase from bakers' yeast. *Biochemistry* (25): p.5673-5677.
- [122] Grandier-Vazeille, X., Bathany, K., Chaignepain, S., Camougrand, N., Manon, S., and Schmitter, J.M. (2001) Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry* (40): p.9758-9769.
- [123] Boubekur, S., Camougrand, N., Bunoust, O., Rigoulet, M., and Guerin, B. (2001) Participation of acetaldehyde dehydrogenases in ethanol and pyruvate metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* (268): p.5057-5065.
- [124] Wenzel, T.J., van den Berg, M.A., Visser, W., van den Berg, J.A., and Steensma, H.Y. (1992) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking the E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase complex. *Eur J Biochem* (209): p.697-705.
- [125] Mok, J., Zhu, X., and Snyder, M. (2011) Dissecting phosphorylation networks: lessons learned from yeast. *Expert Rev Proteomics* (8): p.775-786.
- [126] Nakai, K., and Horton, P. (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* (24): p.34-36.
- [127] Skala, J., Purnelle, B., Crouzet, M., Aigle, M., and Goffeau, A. (1991) The open reading frame YCR101 located on chromosome III from *Saccharomyces cerevisiae* is a putative protein kinase. *Yeast* (7): p.651-655.
- [128] Ferre, F., and Clote, P. (2006) DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res* (34): p.W182-185.

-
- [129] Sigrist, C.J., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., Bulliard, V., Bairoch, A., and Hulo, N. (2010) PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res* (**38**): p.D161-166.
- [130] Luttik, M.A., Kotter, P., Salomons, F.A., van der Klei, I.J., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. *J Bacteriol* (**182**): p.7007-7013.
- [131] Zabriskie, T.M., and Jackson, M.D. (2000) Lysine biosynthesis and metabolism in fungi. *Nat Prod Rep* (**17**): p.85-97.
- [132] Zhang, X., Lester, R.L., and Dickson, R.C. (2004) Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J Biol Chem* (**279**): p.22030-22038.
- [133] Przybyla-Zawislak, B., Gadde, D.M., Ducharme, K., and McCammon, M.T. (1999) Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes. *Genetics* (**152**): p.153-166.
- [134] Nagarajan, L., and Storms, R.K. (1997) Molecular characterization of GCV3, the *Saccharomyces cerevisiae* gene coding for the glycine cleavage system hydrogen carrier protein. *J Biol Chem* (**272**): p.4444-4450.
- [135] Schonauer, M.S., Kastaniotis, A.J., Kursu, V.A., Hiltunen, J.K., and Dieckmann, C.L. (2009) Lipoic acid synthesis and attachment in yeast mitochondria. *J Biol Chem* (**284**): p.23234-23242.
- [136] Lawson, J.E., Niu, X.D., and Reed, L.J. (1991) Functional analysis of the domains of dihydrolipoamide acetyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* (**30**): p.11249-11254.
- [137] Repetto, B., and Tzagoloff, A. (1990) Structure and regulation of KGD2, the structural gene for yeast dihydrolipoyl transsuccinylase. *Mol Cell Biol* (**10**): p.4221-4232.
- [138] Önder, O., Yoon, H., Naumann, B., Hippler, M., Dancis, A., and Daldal, F. (2006) Modifications of the lipoamide-containing mitochondrial subproteome in a yeast mutant defective in cysteine desulfurase. *Mol Cell Proteomics* (**5**): p.1426-1436.
- [139] Smith, D.A., Morgan, B.A., and Quinn, J. (2010) Stress signalling to fungal stress-activated protein kinase pathways. *FEMS Microbiol Lett* (**306**): p.1-8.
- [140] Strumilo, S. (2005) Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Acta Biochim Pol* (**52**): p.759-764.
- [141] Wieland, O.H. (1983) The mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* (**96**): p.123-170.
- [142] Reed, L.J. (1981) Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by a phosphorylation-dephosphorylation cycle. *Curr Top Cell Regul* (**18**): p.95-106.
- [143] Reed, L.J. (2001) A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes. *J Biol Chem* (**276**): p.38329-38336.

-
- [144] Bao, H., Kasten, S.A., Yan, X., and Roche, T.E. (2004) Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2 activity limited and further inhibited by slowing down the rate of dissociation of ADP. *Biochemistry* (**43**): p.13432-13441.
- [145] Roche, T.E., Baker, J.C., Yan, X., Hiromasa, Y., Gong, X., Peng, T., Dong, J., Turkan, A., and Kasten, S.A. (2001) Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* (**70**): p.33-75.
- [146] Sugden, M.C., and Holness, M.J. (2006) Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch Physiol Biochem* (**112**): p.139-149.
- [147] Seyda, A., Chun, K., Packman, S., and Robinson, B.H. (2001) A case of PDH-E1 alpha mosaicism in a male patient with severe metabolic lactic acidosis. *J Inherit Metab Dis* (**24**): p.551-559.
- [148] Brown, G.K., Otero, L.J., LeGris, M., and Brown, R.M. (1994) Pyruvate dehydrogenase deficiency. *J Med Genet* (**31**): p.875-879.
- [149] Maj, M.C., MacKay, N., Levandovskiy, V., Addis, J., Baumgartner, E.R., Baumgartner, M.R., Robinson, B.H., and Cameron, J.M. (2005) Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: identification of the first mutation in two brothers and restoration of activity by protein complementation. *J Clin Endocrinol Metab* (**90**): p.4101-4107.
- [150] Robinson, B.H., and Sherwood, W.G. (1975) Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: a cause of congenital chronic lactic acidosis in infancy. *Pediatr Res* (**9**): p.935-939.
- [151] Steensma, H.Y., Tomaska, L., Reuven, P., Nosek, J., and Brandt, R. (2008) Disruption of genes encoding pyruvate dehydrogenase kinases leads to retarded growth on acetate and ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (**25**): p.9-19.
- [152] Denton, R.M., Randle, P.J., Bridges, B.J., Cooper, R.H., Kerbey, A.L., Pask, H.T., Severson, D.L., Stansbie, D., and Whitehouse, S. (1975) Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase. *Mol Cell Biochem* (**9**): p.27-53.
- [153] Yeaman, S.J., Hutcheson, E.T., Roche, T.E., Pettit, F.H., Brown, J.R., Reed, L.J., Watson, D.C., and Dixon, G.H. (1978) Sites of phosphorylation on pyruvate dehydrogenase from bovine kidney and heart. *Biochemistry* (**17**): p.2364-2370.
- [154] Sugden, P.H., Hutson, N.J., Kerbey, A.L., and Randle, P.J. (1978) Phosphorylation of additional sites on pyruvate dehydrogenase inhibits its re-activation by pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J* (**169**): p.433-435.
- [155] Harris, R.A., Bowker-Kinley, M.M., Huang, B., and Wu, P. (2002) Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Adv Enzyme Regul* (**42**): p.249-259.
- [156] Patel, M.S., and Roche, T.E. (1990) Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J* (**4**): p.3224-3233.
- [157] Milne, J.L., Shi, D., Rosenthal, P.B., Sunshine, J.S., Domingo, G.J., Wu, X., Brooks, B.R., Perham, R.N., Henderson, R., and Subramaniam, S. (2002) Molecular architecture and mechanism of an icosahedral pyruvate dehydrogenase complex: a multifunctional catalytic machine. *EMBO J* (**21**): p.5587-5598.

-
- [158] Tuganova, A., and Popov, K.M. (2005) Role of protein-protein interactions in the regulation of pyruvate dehydrogenase kinase activity. *Biochem J* (**387**): p.147-153.
- [159] Kato, M., Chuang, J.L., Tso, S.C., Wynn, R.M., and Chuang, D.T. (2005) Crystal structure of pyruvate dehydrogenase kinase 3 bound to lipoyl domain 2 of human pyruvate dehydrogenase complex. *EMBO J* (**24**): p.1763-1774.
- [160] Patel, M.S., and Korotchkina, L.G. (2006) Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans* (**34**): p.217-222.
- [161] Popov, K.M., Zhao, Y., Shimomura, Y., Kuntz, M.J., and Harris, R.A. (1992) Branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase. Molecular cloning, expression, and sequence similarity with histidine protein kinases. *J Biol Chem* (**267**): p.13127-13130.
- [162] Machius, M., Chuang, J.L., Wynn, R.M., Tomchick, D.R., and Chuang, D.T. (2001) Structure of rat BCKD kinase: nucleotide-induced domain communication in a mitochondrial protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (**98**): p.11218-11223.
- [163] Perham, R.N. (2000) Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annu Rev Biochem* (**69**): p.961-1004.
- [164] Wittig, I., and Schagger, H. (2005) Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* (**5**): p.4338-4346.
- [165] Korotchkina, L.G., and Patel, M.S. (2001) Site specificity of four pyruvate dehydrogenase kinase isoenzymes toward the three phosphorylation sites of human pyruvate dehydrogenase. *J Biol Chem* (**276**): p.37223-37229.
- [166] Maj, M.C., Cameron, J.M., and Robinson, B.H. (2006) Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: orphan disease or an under-diagnosed condition? *Mol Cell Endocrinol* (**249**): p.1-9.
- [167] Karpova, T., Danchuk, S., Kolobova, E., and Popov, K.M. (2003) Characterization of the isozymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase: implications for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Biochim Biophys Acta* (**1652**): p.126-135.
- [168] Journo, D., Mor, A., and Abeliovich, H. (2009) Aup1-mediated regulation of Rtg3 during mitophagy. *J Biol Chem* (**284**): p.35885-35895.
- [169] Cassanova, N., O'Brien, K.M., Stahl, B.T., McClure, T., and Poyton, R.O. (2005) Yeast flavohemoglobin, a nitric oxide oxidoreductase, is located in both the cytosol and the mitochondrial matrix: effects of respiration, anoxia, and the mitochondrial genome on its intracellular level and distribution. *J Biol Chem* (**280**): p.7645-7653.
- [170] Perez-Valle, J., Jenkins, H., Merchan, S., Montiel, V., Ramos, J., Sharma, S., Serrano, R., and Yenush, L. (2007) Key role for intracellular K⁺ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol Cell Biol* (**27**): p.5725-5736.
- [171] Oswald, C., Krause-Buchholz, U., and Rödel, G. (2009) Knockdown of human COX17 affects assembly and supramolecular organization of cytochrome c oxidase. *J Mol Biol* (**389**): p.470-479.
- [172] Sopko, R., Papp, B., Oliver, S.G., and Andrews, B.J. (2006) Phenotypic activation to discover biological pathways and kinase substrates. *Cell Cycle* (**5**): p.1397-1402.

- [173] Zahedi, R.P., Sickmann, A., Boehm, A.M., Winkler, C., Zufall, N., Schönfish, B., Guiard, B., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2006) Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol Biol Cell* (**17**): p.1436-1450.
- [174] Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., Punna, T., Peregrin-Alvarez, J.M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M.D., Paccanaro, A., Bray, J.E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D.P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M.M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S.R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J.J., Gandhi, K., Thompson, N.J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M.H., Butland, G., Altaf-Ul, A.M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J.S., Ingles, C.J., Hughes, T.R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S.J., Emili, A., and Greenblatt, J.F. (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* (**440**): p.637-643.
- [175] Niu, X.D., Browning, K.S., Behal, R.H., and Reed, L.J. (1988) Cloning and nucleotide sequence of the gene for dihydrolipoamide acetyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (**85**): p.7546-7550.
- [176] Fujiwara, K., Okamura-Ikeda, K., and Motokawa, Y. (1991) Lipoylation of H-protein of the glycine cleavage system. The effect of site-directed mutagenesis of amino acid residues around the lipoyllysine residue on the lipoate attachment. *FEBS Lett* (**293**): p.115-118.
- [177] Chen, X.J., Wang, X., Kaufman, B.A., and Butow, R.A. (2005) Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* (**307**): p.714-717.
- [178] Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsasser, H.P., Hausmann, A., Netz, D.J., Pierik, A.J., Stehling, O., Urzica, E., and Mühlenhoff, U. (2006) Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* (**1763**): p.652-667.
- [179] Gelling, C., Dawes, I.W., Richhardt, N., Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2008) Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol Cell Biol* (**28**): p.1851-1861.
- [180] Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* (**77**): p.669-700.
- [181] Mühlenhoff, U., Gerl, M.J., Flauger, B., Pirner, H.M., Balser, S., Richhardt, N., Lill, R., and Stolz, J. (2007) The ISC [corrected] proteins Isa1 and Isa2 are required for the function but not for the de novo synthesis of the Fe/S clusters of biotin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* (**6**): p.495-504.
- [182] Hirasaki, M., Horiguchi, M., Numamoto, M., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Nogi, Y., and Harashima, S. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase Ppz1 and protein kinases Sat4 and Hal5 are involved in the control of subcellular localization of Gln3 by likely regulating its phosphorylation state. *J Biosci Bioeng* (**111**): p.249-254.
- [183] Costanzo, M.C., Hogan, J.D., Cusick, M.E., Davis, B.P., Fancher, A.M., Hodges, P.E., Kondu, P., Lengieza, C., Lew-Smith, J.E., Lingner, C., Roberg-Perez, K.J., Tillberg, M., Brooks, J.E., and Garrels, J.I. (2000) The yeast proteome database (YPD) and *Caenorhabditis elegans* proteome database (WormPD): comprehensive

- resources for the organization and comparison of model organism protein information. *Nucleic Acids Res* (**28**): p.73-76.
- [184] Csank, C., Costanzo, M.C., Hirschman, J., Hodges, P., Kranz, J.E., Mangan, M., O'Neill, K., Robertson, L.S., Skrzypek, M.S., Brooks, J., and Garrels, J.I. (2002) Three yeast proteome databases: YPD, PombePD, and CalPD (MycoPathPD). *Methods Enzymol* (**350**): p.347-373.
- [185] Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* (**25**): p.3389-3402.
- [186] Mallory, J.C., and Petes, T.D. (2000) Protein kinase activity of Tel1p and Mec1p, two *Saccharomyces cerevisiae* proteins related to the human ATM protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (**97**): p.13749-13754.
- [187] Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N.N., Inagaki, F., Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., and Ohsumi, Y. (2005) Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol* (**25**): p.7239-7248.
- [188] Ernsting, B.R., and Dixon, J.E. (1997) The PPS1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* codes for a dual specificity protein phosphatase with a role in the DNA synthesis phase of the cell cycle. *J Biol Chem* (**272**): p.9332-9343.
- [189] Posas, F., Camps, M., and Arino, J. (1995) The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J Biol Chem* (**270**): p.13036-13041.
- [190] Luke, M.M., Della Seta, F., Di Como, C.J., Sugimoto, H., Kobayashi, R., and Arndt, K.T. (1996) The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol Cell Biol* (**16**): p.2744-2755.

Verwendete Datenbanken / Online-Software

Datenbanken für DNA- und Proteinsequenzen sowie Basisinformationen zu Proteinfunktionen von *S. cerevisiae*:

Saccharomyces genome database (SGD) [100]

www.yeastgenome.org

Yeast proteome database (YPD) [183,184]

<https://portal.biobase-international.com>

SwissProt/UniProtKB [98]

<http://www.uniprot.org/>

Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen:

MITOPROT [109]

<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>

PSORT II [126]

<http://psort.hgc.jp/form2.html>

Vorhersage posttranslationaler Modifikationsstellen von Proteinen:

DiANNA [128]

<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>

Prosite Scan [129]

<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>

DNA- und Protein-Sequenzvergleiche (*Alignment*):

ClustalW2-EBI [118]

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

NCBI BLAST [185]

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

7 Anhang

Tab. A1 Weitere PKasen bzw. PPasen mit potentieller mt Funktion.

Die bioinformatischen Analysen des Proteoms von *S.cerevisiae* wurden mit der „GOterm“-Funktion in der SGD (Stand 02/2007, www.yeastgenome.org, [100]) gefiltert, wobei als Kriterien die Existenz einer Kinase- oder Phosphatasedomäne (-funktion) sowie eine mt oder unbekannte Lokalisation genutzt wurden. Die Kinase- bzw. Phosphatase-Aktivität sowie Vorhersagen/experimentelle Belege für eine mt Lokalisation der weiteren Kandidaten sind angegeben. Die zehn untersuchten Kandidatenproteine sind im Ergebnisteil (vgl. 3.3.1) aufgelistet.

	Name (systematisch)	Standard- name, Synonym	Klassifizierung*	Akti- vität <i>in vitro</i>	mt Lokalisation	
					<i>in silico</i> **	<i>in vivo</i> ***
Kinasen						
# 11	Ydr477wp	Snf1p	Ser/Thr-Kase; AMPK-Familie	[25]	13 %	[102,103]
# 12	Ypr054wp	Smk1p	Ser/Thr-PKase; MAPK-Familie	[25]	30 %	[102,103]
# 13	Yhr135cp	Yck1p	Ser/Thr-PKase; Casein-Kinase Familie	[25]	75 %	[102]
# 14	Ycr073cp	Ssk22p	Ser/Thr-PKase; MAPK- Kinase-Kinase-Familie	[25]	5%	[101]
# 15	Ybl016wp	Fus3p	Ser/Thr-PKase; MAPK-Familie	[25]	35 %	[102,103]
# 16	Ybl088cp	Tel1p	putative PIK oder PKase	[186]	1 %	[101-103]
# 17	Ybr097wp	Vps15p	Ser/Thr-PKase	[25]	1 %	[102,103]
# 18	Ybr136wp	Mec1p	putative PIK oder PKase	[186]	12 %	[102,103]
# 19	Ykl203cp	Tor2p	Ser/Thr-PKase; PIK Homolog	[187]	33 %	[101-103]
# 20	Ygl119wp	Coq8p	putative PKase	--	100 %	[101-103]
# 21	Yll019cp	Kns1p	Ser/Thr/Tyr-PKase; CLK- <i>like</i> Familie	[25]	40 %	--
# 22	Ydl025cp	Mps1p	Ser/Thr/Tyr-PKase	[25]	44 %	--
# 23	Ypr106wp	Isr1p	putative PKase	[25]	11 %	--
# 24	Ydl079cp	Mrk1p	Ser/Thr-Proteinkinase; GSK3- <i>like</i> Familie	[25]	37 %	--
# 25	Ydr466wp	Pkh3p	Ser/Thr-PKase; PKA-verwandt	[25]	8 %	--
# 26	Ygl158wp	Rck1p	Ser/Thr-PKase; CaMK- <i>like</i> Familie	[25]	4 %	--
# 27	Yjl165cp	Hal5p	Ser/Thr-Proteinkinase; NPR- <i>like</i> Familie	[25]	20 %	--
# 28	Ykl161cp	Kdx1p	Ser/Thr-PKase; MAPK-Familie	[25]	92 %	--
# 29	Ygl083wp	Scy1p	putative PKase	--	23 %	--

	Name (systematisch)	Standard- name, Synonym	Klassifizierung*	Akti- vität <i>in vitro</i>	mt Lokalisation	
					<i>in silico</i> **	<i>in vivo</i> ***
Kinasen (Fortsetzung)						
# 30	Yol113wp	Skm1p	Ser/Thr-PKase; STE20- <i>like</i> Familie	[25]	8 %	--
# 31	Yol128cp	Ygk3p	Ser/Thr-PKase; GSK3- <i>like</i> Familie	[25]	14 %	--
# 32	Ypl150wp	--	Ser/Thr-PKase; AMPK-Familie	[25]	43 %	--
# 33	Ypl031cp	Pho85p	Ser/Thr/Tyr-PKase; CDK-Familie	[25]	42 %	--
Phosphatasen						
# 34	Ybr276cp	Pps1p	Ser/Thr/Tyr-PPase; PTP-Familie	[188]	14 %	--
# 35	Ydr436wp	Ppz2p	Ser/Thr-PPase; PP1-Familie	[189]	2 %	--
# 36	Ygl229cp	Sap4p	Komponente des Sit4p Ser/Thr-PPase-Komplexes	[190]	4 %	[102,103]
# 37	Yjl098wp	Sap185p	Komponente des Sit4p Ser/Thr-PPase-Komplexes	[190]	32 %	[102,103]
*	Die Klassifizierung der PKasen erfolgte nach Hunter und Plowman [20] und die der PPasen nach Sakumoto <i>et al.</i> [26].					
**	Durch MITOPROT [109] vorhergesagte Wahrscheinlichkeit einer potentiellen mt Lokalisation des Proteins.					
***	Proteine wurden in massenspektrometrischen Analysen hochreiner Mitochondrien identifiziert.					

Tab. A2 Setup des DIGE-Experimentes zur Analyse des mt Proteoms der Kinase- bzw. Phosphatase-Deletionsmutanten.

Für jedes Gel sind die entsprechenden Proben sowie verwendeten Farbstoffe (CyDye) angegeben. Die entsprechenden Bilder nach 2D-Separation können dem digitalen Anhang (Ordner „2D DIGE“) entnommen werden.

Gel	Probe	CyDye
# 1	Standard	Cy2
	BY4741 (WT)	Cy5
# 2	Standard	Cy2
	$\Delta yil042c$ ($\Delta pkp1$)	Cy3
	$\Delta ycr008w$ ($\Delta sat4$)	Cy5
# 3	Standard	Cy2
	$\Delta ygl059w$ ($\Delta pkp2$)	Cy3
	$\Delta ycr091w$ ($\Delta kin82$)	Cy5
# 4	Standard	Cy2
	$\Delta yor090c$ ($\Delta ppp1$)	Cy3
	$\Delta yol045w$ ($\Delta psk2$)	Cy5
# 5	Standard	Cy2
	$\Delta ycr079w$ ($\Delta ppp2$)	Cy3
	$\Delta ygr052w$ ($\Delta fmp48$)	Cy5
# 6	Standard	Cy2
	$\Delta yhr076w$ ($\Delta ptc7$)	Cy3
	$\Delta ydl230w$ ($\Delta ptp1$)	Cy5
# 7	Standard	Cy2
	BY4741 (WT)	Cy3
# 8	Standard	Cy2
	$\Delta ycr008w$ ($\Delta sat4$)	Cy3
	$\Delta yil042c$ ($\Delta pkp1$)	Cy5
# 9	Standard	Cy2
	$\Delta ycr091w$ ($\Delta kin82$)	Cy3
	$\Delta ygl059w$ ($\Delta pkp2$)	Cy5
# 10	Standard	Cy2
	$\Delta yol045w$ ($\Delta psk2$)	Cy3
	$\Delta yor090c$ ($\Delta ppp1$)	Cy5
# 11	Standard	Cy2
	$\Delta ygr052w$ ($\Delta fmp48$)	Cy3
	$\Delta ycr079w$ ($\Delta ppp2$)	Cy5
# 12	Standard	Cy2
	$\Delta ydl230w$ ($\Delta ptp1$)	Cy3
	$\Delta yhr076w$ ($\Delta ptc7$)	Cy5

PDK1	-----MRLARLLRGAALAGPGPLRAAGFSRSFSSDSGSSPA	37
PDK2	-----MRVWVALLKNA	11
PDK3	-----MRLFRWL	7
PDK4	-----MKAARFVLRSAAGSLN	15
Yil042cp	-----MWKIMRSWKCGGMRWAHRQRPSSHELLSQLSFDQHYK	36
Ygl059wp	MSKYQINCIRYRHLRTSNISQIPDFTKYCIGPVNEELAPYIMETMKAYPSNSEYINPQH	60
PDK1	SERGVPGQVDFYARFSPSPLSMKQFLDFGS-----VNACEKTSFMFLRQELPVRLANIMK	92
PDK2	SLAGAPKYLEHFSKFSPLSMKQFLDFGS-----SNACEKTSFTFLRQELPVRLANIMK	66
PDK3	LKQVPVKQIERYSRFSPLSIKQFLDFGR-----DNACEKTSYMFRLKELPVRLANIMK	62
PDK4	GAGLVPREVEHFSRYSPLSMKQLDFGS-----ENACEKTSFAFLRQELPVRLANILK	70
Yil042cp	IRSNIELLIQDYASKPIAPLNEYFLQYRPF---LTKKEEYMLTIKTINLLSLTCKRLN	93
Ygl059wp	YYHNRTVLVENEYLRSPNPVSLTLQAQYYDDSTKLTRTKIINSKGKVFKEELVIRIAHKLN	120
	:: : . * : . : : . : *	
PDK1	EISLLPDNLLRTPSVQLVQSWYIQSLQELLDKFKD-SAEDAKAIYDFTDVTIRIRNR	151
PDK2	EINLLPDRVLSTPSVQLVQSWYVQSLLDIMEFLDK-DPEDHRTLSQFTDALVTIRNR	125
PDK3	EVNLLPDNLLNRPSVGLVQSWYMQSFLELLEYENK-SPEDPQVLDNLFQVLKVRNR	121
PDK4	EIDILPTQLVNTSSVQLVKSQYIQSLMDLVEFHEK-SPDDQKALSDFDVDTLIKVRNR	129
Yil042cp	AIQRLPYNAVINPHIERTNSLYLKSQTLLSIAY---PYELHNPPKIQAKFTELLDD	150
Ygl059wp	QLQQLPFNVVNNFHFVQVYESYNYNIFESFRKYPTIRTLEDASQFADFICKNMLEGNTLNL	180
	:: ** : . : . . * : : : . : : . : .	
PDK1	VIPTMAQGVIEYKESFGVDPVTSQNVQYFLDRFYMSRISIRMLLNQHSLLFGGKKGSPS	211
PDK2	VVPTMAQGVLEYKDTYGDDPVSNNQIQYFLDRFYLSRISIRMLINQHTLFDG--STNPA	183
PDK3	VVPTMAQGVIEYKEKFGFDPFISTNIQYFLDRFYTNRISFRMLINQHTLFLFG--DTNPV	179
PDK4	VVPTMAQGIIEYKDACTVDPTVNQNLQYFLDRFYMNRISTRMLMNQHILIFSD---SQTG	186
Yil042cp	AIVVLAKGLQEIQSCYP----KFQISQFLNHLKERITMKLLVTHYLSLMAQ--NKGDT	203
Ygl059wp	PHLIMGALLECTILDLYP-----REKMDQLLSDLLRARISRRLIVEEHVSITANYTSGKEE	235
	: . : . : : : : : : : : : : : : :	
PDK1	HRKHIGSINPNCNVLEVIKDGyenARRLCDLYYINSPELELEELNAKSPGQPIQVYVPS	271
PDK2	HPKHIGSIDPNCNVSEVVKDAYDMAKLLCDKYMASPDLEIQEINAANSKQPIHMYVPS	243
PDK3	HPKHIGSIDPTCNVADVVKDAYETAKMLCEQYYLVAPLEVEEFNAKAPDKPIQVYVPS	239
PDK4	NPSHIGSIDPNCNVAVVQDAFECRMLCDQYYLSPELKLTVQVNGKFPDQPIHIVVPS	246
Yil042cp	NKRMIGILHRDLPIAQLIKHVSVDYVNDICFVKFN---TQRTPVLIHPPSQDITFTCIPP	259
Ygl059wp	NTLVLGDIQEQCSAKKYLLEASEESQKFQIDMYFKDIPMEFIIEG---DTQLSFYFLPT	292
	: : * : : : : : : : : : : : : : *	
PDK1	HLYHMFELFELFKNAMRATMEHHAN-RGVYPPPIQVHVTLGNE-DLTVKMSDRGGGVPLRKID	329
PDK2	HLYHMFELFELFKNAMRATVESHE-SLILPPIKVMVALGEED-LSIKMSDRGGGVPLRKIE	301
PDK3	HLFHMLFELFELFKNSMRATVELYEDRKEGYPAVKTLVTLGKED-LSIKISDLGGGVPLRKID	298
PDK4	HLHHMLFELFELFKNAMRATVEHQEN-QPSLTPIEVIVVLGKED-LTIKISDRGGGVPLRIID	304
Yil042cp	ILEYIMTEVFKNFAFEAIALGKE---HMPPIEINLLKPDDDELYLRIRHGGGITPEVEA	315
Ygl059wp	HLKYLLGEILRLTYEATMKHYIRKGLEKPEPIIVTVVSNDESYLFRISDKAGGVVLHDDEN	352
	* : : : * : : : * : : : : : : : : : : : *	
PDK1	RLFNMYSTAPRP-----RVETSRAVPLAGFGYGLPI	361
PDK2	RLFSYMYSTAPTP-----QPGTG-GTPLAGFGYGLPI	332
PDK3	RLFNMYSTAPRP-----SLEPTRAAPLAGFGYGLPI	330
PDK4	RLFSYTYSTAPTP-----VMDNSRNAPLAGFGYGLPI	336
Yil042cp	LMFNYSYSTHTQQSAD-----SESTDLPGEQINNVS GMGFGGLPM	354
Ygl059wp	LWSFGKSKERAQESLNNFHKLPGLQTVTSIYDEVHSHTKYNSKLKSLQSITLKPYMHTSLE	412
	: . : . : . : . : . : . : . : .	
PDK1	SRLYAYFYQGDGLKLYSLEGYGTDAVIYIKALS--TDSIERLPVYNKAAWKHNTNHEADD	419
PDK2	SRLYAKYFQGDGLQLFSMEGFGTDAVIYIKALS--TDSVERLPVYNKSAWRHYQTIEAGD	390
PDK3	SRLYARYFQGDGLKLYSMGVTDAVIYIKALS--SESFERLPVFNKSAWRHYKTTPEADD	388
PDK4	SRLYAKYFQGDGLNLYSLSGYGTDAIYIKALS--SESIEKLPVFNKSAFKHYQMSSEADD	394
Yil042cp	CKTYLELFGGKIDVQSLLGWGTDVYIKLKGPS--KTALLSKK-----	394
Ygl059wp	PMSYPSIINGHIKYEETPLIELLKRSFRYKLGIGLAMCKVYAEYWNGLSLHSMMPGYGTDV	472
	* : * : . : : : * .	
PDK1	WCVPSREPDMTTFRSA--	436
PDK2	WCVPSTEPKNTSTYRVS--	407
PDK3	WSNPSSEPRDASKYKAKQ--	406
PDK4	WCIPSREPKNLAKEVAM--	411
Yil042cp	-----	
Ygl059wp	VLKLGNLMKHTKKLQLDKV	491

Abb. A1 Sequenzvergleich der humanen PDH-Kinasen (PDK 1-4) und der putativen *S. cerevisiae* PDH-Kinasen Yil042cp und Ygl059wp

Das Sequenzalignement der angegebenen Proteine wurde mit der ClustalW2 Software [118] durchgeführt. Unterhalb der Sequenzen ist der Konsensus angegeben („*“ konservierte AS in allen Sequenzen; „.“ AS mit schwacher Homologie in allen Sequenzen, „:“ AS mit hoher Homologie in allen Sequenzen). Hochkonservierte Aminosäuren, welche die Domänen I-V mit PDH-Kinasen definieren [46], sind gelb markiert. Die konservierte Glycin-reichen Abschnitte der Domänen III und V, die an der Bildung der Nukleotidbindetasche beteiligt sind [162], sind über der Sequenz rot markiert.

PDP1	-MPAPTQLFFPLIRNCELSRIYGTACYCHHKHLCSSSYIPQSRLRYTPHPAYATFCRPK	59
PDP2	----MSSTVSYWILNSTRNSIATLQGGRRLYSRYVSNRNKLKWRLFSRVPPTLNSSPCGG	56
Yor090cp	MSPLTRTVAIKKTKVKVLSKCQSGREYTKQFLQRAYSTSHANSTYYSRTKLFISSHSKALN	60
Ycr079wp	-----MRLGNAYAYCKPSQNVGLKLDLLRGLPGYVGHATSRLN	38
	..	
PDP1	ENWWQYTGRRYASTPQKFYLTTPQVNSILKANEYSFKVPEFDGKNVSSILGFDSNQLPA	119
PDP2	FTLCKAYRHTSTEEDDFHLQLSPEQINEVLRAGETHKILDLESRVNSVLRFESNQLAA	116
Yor090cp	IALLSGSLLLTYSYSPKKILSLDTINGIKDYSTNTSGNINMPSNPNGTETQKSQRSQN	120
Ycr079wp	RLENQDNYSIKMMRSPNAYGSALNCVFDGHGEGKAQLSLLADKLCSSLDFF-----	92
	. : : . . . : : .	
PDP1	NAPIEDRRSAATCLQTRGMLLGVDGHCACQAVSERLFYYIAVSLPHETLLEIENA	179
PDP2	NSPVEDRRGVASCLQTNGLMFGIFDGHGGHACAQAVSERLFYYVAVSLMSHQTLHEMEGA	176
Yor090cp	DQSVLILNDSKIEAKLHDREESHFVNRTGTIFRYDVAQLPSNHPIEDDHVEQIITIPIES	180
Ycr079wp	-EPSWDKQDLKKLVQEYARR--FPEGNYWKHKLSTFEKFYNKFIKNCNSKQELLMKEG	148
	. . . : *	
PDP1	VESG---RALLPILQWHKHPNDYFSKEASKLYFNSLRTYWQELIDLN---TGESTDIDVK	233
PDP2	MESM---KPLLPILHLWKHPGDSIYKDVTSVHLDHLRVYQELLDLH---MEMG--LSIE	228
Yor090cp	EDGKSIEKDLYFFGIFDGHGGPFTSEKLSKDLVRVYVAYQLGQVYDQNKTVFHSDPNQLID	240
Ycr079wp	DSAILG--QNGGRMIFDKMGNIIDKIALLTDLRLRLFYGFARFPLD---QCCGLGTAAG	203
	.. : . . *	
PDP1	EALINAFKRLDNDISLEAQVGDP---NSFLNYLVLRVAFSGATACVAHVDGVDLHVANT	289
PDP2	EALMYSFQRLDSDISLEIQAPLE---DEVTRNLSLQVAFSGATACMAHVDGIHLHVANA	284
Yor090cp	SAISKGFLKLDNDLVIESFRKLFQDPNNTNIANTLPAISGSCALLSYNSTNSILKVAVT	300
Ycr079wp	STASSIFLYPYDDPNAPIDEGKD-----DDSWIISHSGLLKLIIVTQV	245
	. : * . * : : * * : .	
PDP1	GDSRAMLGVEEDGSWSAVTSLNDHNAQNERELERLKLHHPKSEAKSVVKQDRLLGLLMP	349
PDP2	GDCRAILGVQEDNGMWSCPLTRDHNAWNQAELSRLKREHPSEEDRTIIMEDRLLGVLIP	344
Yor090cp	GDSRALICGLDNEGNWTVKSLSTDQTDGNDLDEVRRIRKEHPGEP--NVIRNGRILGSLQP	358
Ycr079wp	GDSKIILCDQD---GIAHALTTTHHINSSRERHRLSID-PSRLDPDAFGETRFLNNFAN	300
	**.: : : . *: : . * *: : * . : *: . :	
PDP1	FRAFGDVFKWSIDLQKRVIESGPDQLNDNEYTKFIPPNYHTPPYLTAPEVPTYHRLRPQ	409
PDP2	CRAFGDVQLKWSKELQRSILERGFNTEALN-IYQFTPPHYTPPYLTAPEVPTYHRLRPQ	403
Yor090cp	SRAFGDYRYKIKEVDGKPLSDLP---EVAKLYFRREPRDFKTPPYVTAEPVITSAKIGEN	415
Ycr079wp	TRSGFDVAGKPYGISSE-----PDIFSFLVGNTLHLP-----RSERSKLPFNGD	344
	*:*** * . . *	
PDP1	DKFLVLATDGLWETMHRQDVVRIVG-----EYLTGMHHQQPIAVGGYKV	453
PDP2	DKFLVLASDGLWDMLSNEDVVRLLV-----GHLEADWHK-TDLAQRPA	446
Yor090cp	TKFMVMGSDGLFELLTNEEIASLVIRWMDKNMNLAPVKAEPGKLPKVIDVSEDKEAQRPA	475
Ycr079wp	ECFLALVTDGITNKLADQEVVDLIT-----ST	371
	*.: : **: : : : : .	
PDP1	TLGQMHLGLTERRTKMSSVFEDQNAATHLIRHAVGNNEFGTVDHERLSKMLSPEELARM	513
PDP2	NLGLMQSLLLQRKASG-LHEADQNAATRLIRHAIGNNEYGEMEAERLAAMLTLPEDLARM	505
Yor090cp	FRYKDNSSSPSGSNPEYLIEDKNVATHLIRNALSAGGR---KEYVSALVSIKPSMSRR	531
Ycr079wp	VNSWGLKKATPQFVAEETIKFIQAIATKHSNATCVVVR-----LSNWGNWPNVDRTG	424
	: ** : *	
PDP1	YRDDITIIIVVQFNHSHVVGAYQNQE-----	537
PDP2	YRDDITVTVVYFNSESIGAYYKGG-----	529
Yor090cp	YRDDLTVTVAFFGDSGTPSIVSNATSIVMNPEATTKPKPRL	572
Ycr079wp	PQRETCLMNAQSNETKLN-----	442
	: : . : . .	

Abb. A2 Sequenzvergleich der humanen PDH-Phosphatasen (PDP 1 und 2) und der putativen *S. cerevisiae* PDH-Phosphatasen Yor090cp und Ycr079wp

Das Sequenzalignment der angegebenen Proteine wurde mit der ClustalW2 Software [118] durchgeführt. Unterhalb der Sequenzen ist der Konsensus angegeben („*“ konservierte AS in allen Sequenzen; „.“ AS mit schwacher Homologie in allen Sequenzen, „:“ AS mit hoher Homologie in allen Sequenzen).

PDA1_Spot 1 (phosphoryliert, MASCOT-Score 361, Sequenzabdeckung 70 %)

```

1  MLAASFQRQP SQLVRGLGAV LRTPTTRIGHV RTMATLKTTD KKAPEDIEGS
51  DTVQIELPES SFESYMLEPP DLSYETSKAT LLQMYKDMVI IRRMEMACDA
101 LYKAKKIRGF CHLSVGQEI AVGIENAITK LDISIITSYRC HGFTFMRGAS
151 VKAVLAELMG RRAGVSYGKG GSMHLYAPGF YGGNGIVGAQ VPLGAGLAFA
201 HQYKNEDACS FTLYGDGASN QGQVFESFNM AKLWNLPVVF CCENNKYGMG
251 TAASRSSAMT EYFKRGQYIP GLKVNMDIL AVYQASKFAK DWCLSGKGPL
301 VLEYETYRYG GHSMSDPGTT YRTRDEIQHM RSKNDPIAGL KMHLIDLGLA
351 TEAEVKAYDK SARKYVDEQV ELADAAPPPE AKLSILFEDV YVKGTTETPTL
401 RGRIPEDTWD FKKQGFASRD

```

PDA1_Spot 2 (nicht-phosphoryliert, MASCOT-Score 52, Sequenzabdeckung 20 %)

```

1  MLAASFQRQP SQLVRGLGAV LRTPTTRIGHV RTMATLKTTD KKAPEDIEGS
51  DTVQIELPES SFESYMLEPP DLSYETSKAT LLQMYKDMVI IRRMEMACDA
101 LYKAKKIRGF CHLSVGQEI AVGIENAITK LDISIITSYRC HGFTFMRGAS
151 VKAVLAELMG RRAGVSYGKG GSMHLYAPGF YGGNGIVGAQ VPLGAGLAFA
201 HQYKNEDACS FTLYGDGASN QGQVFESFNM AKLWNLPVVF CCENNKYGMG
251 TAASRSSAMT EYFKRGQYIP GLKVNMDIL AVYQASKFAK DWCLSGKGPL
301 VLEYETYRYG GHSMSDPGTT YRTRDEIQHM RSKNDPIAGL KMHLIDLGLA
351 TEAEVKAYDK SARKYVDEQV ELADAAPPPE AKLSILFEDV YVKGTTETPTL
401 RGRIPEDTWD FKKQGFASRD

```

Abb. A3 Sequenzabdeckung von Pda1p in den 2D-Spots 1 und 2

Die MS-Spektren der Spots 1 und 2 (vgl. 3.2.4) wurden mittels MASCOT-Software analysiert (Suche ohne variable Modifikationen). Angegeben sind der ermittelte Score sowie die prozentuale Sequenzabdeckung von Pda1p in den beiden Spots. Peptide, die Pda1p zugeordnet werden konnten, sind fett gedruckt. Die putative Phosphorylierungsstelle an Ser313 ist rot unterlegt.

LAT1_Spot 9 (lipoyliert an Lys75)

```

1  MSAFVRVVR  ISRSSVLTRS  LRLQLRCYAS  YPEHTIIGMP  ALSPTMTQGN
51 LAAWTKKEGD  QLSPGEVIAE  IETDKAQMDF  EFQEDGYLAK  ILVPEGTKDI
101 PVNKPIAVYV  EDKADVPAFK  DFKLED SGSD  SKTSTKAQPA  EPQAEKKQEA
151 PAEETKTSAP  EAKKSDVAAP  QGRIFASPLA  KTIALEKGIS  LKDVHGTGPR
201 GRITKADIES  YLEKSSKQSS  QTSGAAAATP  AAATSSTTAG  SAPSPSSTAS
251 YEDVPISTMR  SIIGERLLQS  TQGIPSYIVS  SKISISKLLK  LRQSLNATAN
301 DKYKLSINDL  LVKAITVAAK  RVPDANAYWL  PNENVIRKFK  NVDVSVAVAT
351 PTGLLTPIVK  NCEAKGLSQI  SNEIKELVKR  ARINKLAPEE  FQGGTICISN
401 MGMNNAVNMF  TSIINPPQST  ILAIATVERV  AVEDAAAENG  FSFDNQVTIT
451 GTFDHRTIDG  AKGAEFMKEL  KTVIENPLEM  LL

```

LAT1_Spot 10 (nicht lipoyliert an Lys75)

```

1  MSAFVRVVR  ISRSSVLTRS  LRLQLRCYAS  YPEHTIIGMP  ALSPTMTQGN
51 LAAWTKKEGD  QLSPGEVIAE  IETDKAQMDF  EFQEDGYLAK  ILVPEGTKDI
101 PVNKPIAVYV  EDKADVPAFK  DFKLED SGSD  SKTSTKAQPA  EPQAEKKQEA
151 PAEETKTSAP  EAKKSDVAAP  QGRIFASPLA  KTIALEKGIS  LKDVHGTGPR
201 GRITKADIES  YLEKSSKQSS  QTSGAAAATP  AAATSSTTAG  SAPSPSSTAS
251 YEDVPISTMR  SIIGERLLQS  TQGIPSYIVS  SKISISKLLK  LRQSLNATAN
301 DKYKLSINDL  LVKAITVAAK  RVPDANAYWL  PNENVIRKFK  NVDVSVAVAT
351 PTGLLTPIVK  NCEAKGLSQI  SNEIKELVKR  ARINKLAPEE  FQGGTICISN
401 MGMNNAVNMF  TSIINPPQST  ILAIATVERV  AVEDAAAENG  FSFDNQVTIT
451 GTFDHRTIDG  AKGAEFMKEL  KTVIENPLEM  LL

```

Abb. A4 Sequenzabdeckung von Lat1p in den 2D-Spots 9 und 10

Die MS/MS-Spektren der Spots 9 und 10 (vgl. 3.3.5) wurden mittels MASCOT-Software analysiert (Suche ohne variable Modifikationen). Peptide, die Lat1p zugeordnet werden konnten, sind fett gedruckt. Die putative Lipoyl-Bindedomäne (AS35-109; [136]) ist unterstrichen. Die identifizierte Lipoylierungsstelle an Lys75 ist rot unterlegt.

KGD2_Spot 6 (lipoyliert an Lys114)

```

1  MLSRATRRTAA AKSLVKSKVA RNVMAASFVK RHASTSLFKQ ANKVESLGSI
51  YLSGKKISVA ANPFSITSNR FKSTSIEVPP MAESLTEGSL KEYTKNVGDF
101 IKEDELLATI ETDKIDIEVN SPVSGTVTKL NFKPEDTVTV GEELAQVEPG
151 EAPAEGSGES KPEPTEQAEP SQGVAARENS SEETASKKEA APKKEAAPKK
201 EVTEPKKADQ PKKTVSKAQE PPVASNSFTP FPRTETRVKM NRMRLRIAER
251 LKESQNTAAS LTTFNEVDMS ALMEMRKLYK DEIIKKTGTK FGFMGLFSKA
301 CTLAAKDIPA VNGAIEGDQI VYRDYTDISV AVATPKGLVT PVVRNAESLS
351 VLDIENEIVR LSHKARDGKL TLEDMTGGTF TISNGGVFGS LYGTPIINSP
401 QTAVLGLHGV KERPVTVNGQ IVSRPMMYLA LYTDHRLLDG REAVTFLKTV
451 KELIEDPRKM LLW

```

KGD2_Spot 11 (nicht lipoyliert an Lys114)

```

1  MLSRATRRTAA AKSLVKSKVA RNVMAASFVK RHASTSLFKQ ANKVESLGSI
51  YLSGKKISVA ANPFSITSNR FKSTSIEVPP MAESLTEGSL KEYTKNVGDF
101 IKEDELLATI ETDKIDIEVN SPVSGTVTKL NFKPEDTVTV GEELAQVEPG
151 EAPAEGSGES KPEPTEQAEP SQGVAARENS SEETASKKEA APKKEAAPKK
201 EVTEPKKADQ PKKTVSKAQE PPVASNSFTP FPRTETRVKM NRMRLRIAER
251 LKESQNTAAS LTTFNEVDMS ALMEMRKLYK DEIIKKTGTK FGFMGLFSKA
301 CTLAAKDIPA VNGAIEGDQI VYRDYTDISV AVATPKGLVT PVVRNAESLS
351 VLDIENEIVR LSHKARDGKL TLEDMTGGTF TISNGGVFGS LYGTPIINSP
401 QTAVLGLHGV KERPVTVNGQ IVSRPMMYLA LYTDHRLLDG REAVTFLKTV
451 KELIEDPRKM LLW

```

Abb. A5 Sequenzabdeckung von Kgd2p in den 2D-Spots 6 und 11

Die MS/MS-Spektren der Spots 9 und 10 (vgl. 3.3.5) wurden mittels MASCOT-Software analysiert (Suche ohne variable Modifikationen). Peptide, die Kgd2p zugeordnet werden konnten, sind fett gedruckt. Die putative Lipoyl-Bindedomäne (AS 74-147; [137]) ist unterstrichen. Die identifizierte Lipoylierungsstelle an Lys114 ist rot unterlegt.

GCV3_Spot 8 (lipoyliert an Lys102)

```

1  MLRTTRLWTT RMPTVSKLFL RNSSGNALNK NKLPLYSSQ GPQAVRYTSQ
51  HEWIAVHQDK TAFVGITKYA TDALGDATYV ELPEVGTEIA QGESLGSIES
101 VKSASEIYQP ADGTVEEINT NLEENPGVVN EDPMGDGWL V KMKLGEGVNV
151 EQVEGLMSLE QYEKTLVHDD

```

GCV3_Spot 15 (nicht lipoyliert an Lys102)

```

1  MLRTTRLWTT RMPTVSKLFL RNSSGNALNK NKLPLYSSQ GPQAVRYTSQ
51  HEWIAVHQDK TAFVGITKYA TDALGDATYV ELPEVGTEIA QGESLGSIES
101 VKSASEIYQP ADGTVEEINT NLEENPGVVN EDPMGDGWL V KMKLGEGVNV
151 EQVEGLMSLE QYEKTLVHDD

```

Abb. A6 Sequenzabdeckung von Gcv3p in den 2D-Spots 8 und 15

Die MS/MS-Spektren der Spots 8 und 15 (vgl. 3.3.5) wurden mittels MASCOT-Software analysiert (Suche ohne variable Modifikationen). Peptide, die Gcv3p zugeordnet werden konnten, sind fett gedruckt. Die putative Lipoyl-Bindedomäne (AS 99-113; [134]) ist unterstrichen. Die identifizierte Lipoylierungsstelle an Lys102 ist rot unterlegt.

PDA1_human	-----MRKMLAAVSR-----VLSGASQKPASRVLVASRNFANDATFEIKKCDLHRLE----	47
Pda1p_Sc	MLAASFQRQPSQLVRGLGAVLRTPTRIGHVRTMATLKTTDDKKAPEDIEGSDTVQIELPES	60
	::: : : * ** .:: * .::: .: .:*. :*: .* ::*	
PDA1_human	-----EGPPVTTVLTRDGLKYYRMMQTVRRMELKADQLYKQKIIRGFCHLCDGQEAC	100
Pda1p_Sc	SFESYMLEPPDLSYETSKATLLQMYKDMVIIRMEMACDALYKAKKIRGFCHLSVGQEAI	120
	* * :: : : *: *: * :****: . * ** * *****, ****	
PDA1_human	CVGLEAGINPTDHLITAYRAHGFTFTRGLSVREILAELTGRKGGCAKGGGSMHMYAKNF	160
Pda1p_Sc	AVGIENAITKLDSIITSYRCHGFTFMRGASVKAVLAELMGRRAGVSYGKGGSMHLYAPGF	180
	.**:* .*. * :*:**.****** ** **: :**** **:.* : *****:*** .*	
PDA1_human	YGGNGIVGA-----QGGIFEAYNMAALWKLPCIF	189
Pda1p_Sc	YGGNGIVGAQVPLGAGLAFAHQYKNEDACSFTLYGDGASNQGVFESFNMAKLWNLPVVF	240
	***** *****:***:*** ***:** *	
PDA1_human	ICENNRVGMGTVERAAASTDYKRGDFIPGLRVDGMDILCVREATRFAAAYCRSGKGPI	249
Pda1p_Sc	CCENNKYGMGTAAASRSSAMTEYFKRGQYIPGLKVNMDILAVYQASKFAKWCLSGKGPL	300
	****:*****:..*:* **:***:*****:*****.* :*:** :* *****:	
PDA1_human	LMELQTYRYHGHMSDPGVSYRTREEIQEVRSKSDPIMLLKDRMVNSNLASVEELKEIDV	309
Pda1p_Sc	VLEYETRYRGHMSDPGTTYRTRDEIQHMRSKNDPIAGLKMHLIDLGIATEAEVKAYDK	360
	::* :**** *****:*****:***:*** ** :::: .*: ** *	
PDA1_human	EVRKEIEDAAQFATADPEP---PLEELGYHIYSS---DPPFEVRGANQWIKFKSVS-----	359
Pda1p_Sc	SARKYVDEQVELADAAPPPEAKLSILFEDVYVKGTTETPTLRGRIPEDTWDFKKQGFASRD	420
	..** ::: .:.* * * * *. * .:* . *.. * .:: .**.	

Abb. A7 Sequenzvergleich des humanen PDA1-Proteins mit Pda1p von *S.cerevisiae*

Das Sequenzalignement der homologen Proteine wurde mit der ClustalW2 Software [118] durchgeführt. Unterhalb der Sequenzen ist der Konsensus angegeben („*“ konservierte AS in allen Sequenzen; „.“ AS mit schwacher Homologie in allen Sequenzen, „:“ AS mit hoher Homologie in allen Sequenzen). Die drei an der Regulation des humanen Proteins beteiligten Phosphorylierungsstellen an Ser264 (P1), Ser271 (P2) und Ser203 (P3) [45,153,165], sind gelb markiert. Die Phosphorylierungsstelle von Pda1p an Ser313 ist rot unterlegt.

„Keine Schuld ist dringender als die, Dank zu sagen.“

Marcus Tullius Cicero

In diesem Sinne möchte ich mich bei all denen herzlich bedanken, die direkt oder indirekt zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben!

Allen voran gilt mein Dank Prof. Dr. Gerhard Rödel – für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Anregungen. Außerdem möchte ich mich bei ihm herzlich für seine Aufgeschlossenheit und die IMMER gewährte Unterstützung bedanken.

Prof. Dr. Johannes Herrmann bin ich überaus dankbar für seine Bereitschaft, meine Arbeit als Zweitgutachter zu beurteilen.

Bei Dr. Udo Krause-Buchholz möchte ich mich für die vielen guten Tipps und Tricks im Labor, die wertvollen Hinweise beim Verfassen von Manuskripten und die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung der Praktika bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Cornelia Czapalla für die „institutsübergreifende“ Zusammenarbeit, die schnelle und unkomplizierte Durchführung der MS-Analysen und die interessanten Diskussionen bei der Erörterung der Ergebnisse.

Bei Dr. Kai Ostermann möchte ich mich für das Labormanagement und die stete „Bumix“-Versorgung ☺ bedanken. Renate Werker gilt mein herzlicher Dank für die Unterstützung bei der Erledigung vieler bürokratischer Dinge und für hervorragenden Kaffee ☺.

Ich danke allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Rödel sowie des gesamten Instituts für Genetik für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft sowie das angenehme Arbeitsklima. Besonders erwähnen möchte ich hierbei Jule (mein „Twinnie“☺), Susi, Iris, Kristof, Julia und Andi, mit denen ich nicht nur eine schöne Zeit im Institut verbrachte, sondern die auch außerhalb des Labors zu echten Freunden wurden.

Kristof, „Hartl“ und Claudi – vielen herzlichen Dank für das sorgfältige Korrekturlesen des Werkes.

Meinen Freunden, besonders den „Reiterlingen“, danke ich für meinen Ausgleich jenseits der Arbeit und die vielen schönen und lustigen Stunden, die wir gemeinsam verbrachten.

Meinen Eltern und meinen Brüdern gilt mein herzlicher Dank für die immerwährende Unterstützung und Motivation.

Carsten – danke dafür, dass du in jeder Lebenslage, in guten wie in schlechten Zeiten, zu mir stehst und mich unterstützt.

DANKE!

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Genetik der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerhard Rödel angefertigt. Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden wird anerkannt.

Dresden, den 07.09.2012

Uta Gey

